

**Die Bedeutung von Glucokinase und GLUT2-
Glucosetransporter in insulinproduzierenden Zellen für
die Regulation der glucoseinduzierten Insulinsekretion
und die Toxizität gegenüber diabetogenen Substanzen**

Dem Fachbereich **Chemie** der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Matthias Elsner

geboren am **18.09.1966** in **Cloppenburg**

2000

Referent: Prof. Dr. med. S. Lenzen, Medizinische Hochschule Hannover
Korreferent: PD. Dr. rer. nat. W. Müller, Medizinische Hochschule Hannover
Tag der Promotion: 11.05.1999
Datum der Publikation: 02.05.2000

Abstract

Die Transplantation von insulinproduzierenden Surrogatzellen könnte eine zukunftssträchtige Strategie für die Therapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus darstellen. Es war das Ziel der vorliegenden Dissertation, auf der Basis der RINm5F-Gewebekulturzelllinie mittels molekularbiologischer Methoden insulinproduzierende Ersatzzellen zu generieren, die bedarfsgerecht auf die Stimulation durch physiologische Glucosekonzentrationen eine adäquate Insulinsekretion zeigen. Das glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase sowie der Glucosetransporter GLUT2 koppeln als Glucose-Erkennungsstrukturen Änderungen millimolarer physiologischer Glucosekonzentrationen an den Metabolismus, der eine Signalfunktion für die Auslösung der Insulinsekretion besitzt. Durch Überexpression der Glucokinase in RINm5F-Zellen mit konstitutiver Expression des GLUT2-Glucosetransporters erlangten die Zellen eine Glucoseresponsivität der Insulinsekretion im physiologischen millimolaren Konzentrationsbereich mit einem dreifachen Anstieg gegenüber dem basalen Sekretionsniveau. Nach Implantation der RINm5F-GK-Surrogatzellen in diabetische Ratten war nach einer oralen Glucosebelastung ein signifikanter Anstieg der Seruminsulinkonzentration nachweisbar. Die Glucoseresponsivität der Insulinsekretion und die im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen niedrige basale Sekretionsrate erklären die prolongierte Normalisierung der diabetischen Stoffwechsellage nach Implantation der Zellen.

Die Glucokinase unterliegt in den B-Zellen des Pankreas einer komplexen Regulation, die für die Signalerkennung der Glucose eine entscheidende Rolle spielt. So konnte in der vorliegenden Arbeit an den RINm5F-GK-Zellen gezeigt werden, daß die Glucokinase-Enzymaktivität durch die Bindung an einen bislang unbekanntem Proteinfaktor reguliert wird. Dieser Mechanismus der posttranslationalen Regulation der Glucokinase-Enzymaktivität in insulinproduzierenden Zellen wurde durch eine selektive Permeabilisierungstechnik an RINm5F-GK-Zellen mit Digitonin und Triton X-100 charakterisiert. Dabei konnte ein diffusibles Glucokinasekompartiment mit einer hohen spezifischen Enzymaktivität von einem gebundenen Glucokinasekompartiment mit niedriger spezifischer Enzymaktivität unterschieden werden. Durch proteolytischen Verdau und Hitzebehandlung konnte gezeigt werden, daß der Interaktionspartner der Glucokinase ein Protein ist, dem eine zentrale Rolle bei der Regulation der Glucokinaseaktivität und somit der glucoseinduzierten Insulinsekretion zukommen könnte.

Der Glucosetransporter GLUT2 spielt für die Empfindlichkeit von B-Zellen des Pankreas gegenüber den diabetogenen Substanzen Alloxan und Streptozotocin eine entscheidende Rolle. Aufgrund der sterischen Ähnlichkeit zur Glucose werden Zuckerbindungsstrukturen wie der GLUT2-Glucosetransporter als Ziel- bzw. Transportstrukturen angenommen. RINm5F-Kontrollzellen, die im Vergleich zu normalen B-Zellen keine signifikante Expression des GLUT2-Glucosetransporters zeigten, waren im MTT-Zytotoxizitätsassay unempfindlich gegenüber Alloxan. Glucose schützte die RINm5F-GLUT2-Zellen signifikant gegenüber der Toxizität von Alloxan nicht aber von Streptozotocin. Nur Alloxan nicht aber Streptozotocin inhibierte selektiv die GLUT2-Transportfunktion der RINm5F-GLUT2-Zellen. Somit besitzt der GLUT2-Glucosetransporter unterschiedliche Bedeutung für die selektive B-Zelltoxizität von Alloxan und Streptozotocin. Während die erhöhte Empfindlichkeit von RINm5F-GLUT2-Zellen gegenüber Streptozotocin durch eine erhöhte Transportkapazität für die toxische Substanz erklärt werden kann, scheint das GLUT2-Transporterprotein selbst eine wesentliche Zielstruktur für die Alloxantoxizität zu sein.

Die Glucose-Erkennung durch die Glucokinase und den GLUT2-Glucosetransporter beinhaltet somit verschiedene Aspekte, die für die Funktion der pankreatischen B-Zelle von entscheidender Bedeutung sind. Neben der Grundfunktion in der Stimulus-Sekretionskopplung, die eine Generierung von glucoseresponsiven Surrogatzellen für die Gentherapie des Diabetes mellitus ermöglicht, spielt die posttranslationale Regulation der Glucokinase eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der Enzymaktivität und somit dem Erhalt der Glucoseresponsivität der B-Zelle des Pankreas. Das Expressionsniveau des GLUT2-Glucosetransporters ist zudem von entscheidender Bedeutung für die Empfindlichkeit gegenüber den selektiv B-zelltoxischen und diabetogenen Substanzen Alloxan und Streptozotocin.

Schlüsselworte: Diabetes mellitus, Gentherapie, Insulinsekretion

Abstract

Transplantation of insulin producing surrogate cells could be a forward-looking strategy for the therapy of the insulin dependent diabetes mellitus. It was the aim of the present thesis to generate by using molecular biology techniques on the basis of the RINm5F tissue culture cells a surrogate cell which exhibits a physiological glucose induced insulin secretion. The glucose phosphorylating enzyme glucokinase as well as the glucose transporter GLUT2 are glucose recognition structures and couple changes in the physiological millimolar glucose concentration range to the metabolism which generates the signal for the insulin secretion. By overexpressing the glucokinase in RINm5F cells in which the GLUT2 glucose transporter is constitutively expressed the cells obtained a glucose responsiveness of the insulin secretion in the physiological millimolar concentration range with a 3-fold increase compared to the basal secretion level. After an oral glucose tolerance test with rats in which the RINm5F-GK surrogate cells were implanted a significant increase in the serum insulin concentration was detectable. The glucose responsiveness of the insulin secretion and the in comparison to non transfected RINm5F control cells low basal secretion rate were responsible for the gradual progressive blood glucose normalization after the implantation of the cells.

The glucokinase activity in the B-cell underlies a complex regulation which plays an essential role for the signal recognition of the glucose induced insulin secretion. In the present thesis it is shown that the glucokinase activity in RINm5F-GK cells was affected by an so far unknown protein factor. This mechanism of posttranslational regulation of the glucokinase enzyme activity in insulin producing cells was characterized by a selective permeabilisation technique of RINm5F-GK cells by using Digitonin and Triton X-100. A diffusible glucokinase fraction with high enzyme activity could be distinguished from an intracellularly bound fraction with low activity. It was possible by proteolytic digestion and heat inactivation to show that the interaction structure of the glucokinase is a protein, which might play an essential role in the regulation of the glucokinase activity and consequently in the glucose induced insulin secretion.

The glucose transporter GLUT2 plays an essential role for sensitivity of pancreatic B-cells against the diabetogenic substances alloxan and streptozotocin. Both molecules exhibit a marked structural similarity to glucose. Thus the hexose binding structures glucokinase and the GLUT2 glucose transporter are potential targets or a crucial transporter of the toxins. RINm5F control cells, which showed no significant expression of the GLUT2 glucose transporter compared to normal B-cells, were resistant to alloxan and streptozotocin in the MTT cytotoxicity assay. Through overexpression of the GLUT2 glucose transporter RINm5F cells became sensitive to alloxan and streptozotocin. Glucose provided a significant protection of RINm5F-GLUT2 cells against the toxicity of alloxan but not against streptozotocin. Only alloxan but not streptozotocin selectively inhibited the GLUT2 transport function of RINm5F-GLUT2 cells. Thus the GLUT2 glucose transporter is of differential importance for the selective B-cell toxicity of alloxan and streptozotocin. While the sensitivity of RINm5F-GLUT2 cells to streptozotocin can be explained by an increased transport capacity for this toxin, the GLUT2 transporter protein itself seems to be a target structure for the toxicity of alloxan.

The glucose recognition by glucokinase and GLUT2 glucose transporter include different aspects which are essentially important to the function of the pancreatic B-cell. Apart from the basic function in the stimulus secretion coupling, which allows the generation of glucose responsive surrogate cells for the gene therapy of diabetes mellitus, the posttranslational glucokinase regulation plays an essential role for the maintenance of enzyme activity and glucose responsiveness of the pancreatic B-cell. Moreover the expression level of the GLUT2 glucose transporter has an essential meaning for the sensitivity to the selective B-cell toxic and diabetogenic substances alloxan and streptozotocin.

keywords: Diabetes mellitus, gene therapy, insulin secretion

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Insulin und Diabetes mellitus.....	1
1.2	Glucoseinduzierte Insulinsekretion.....	2
1.3	GLUT2-Glucosetransporter	4
1.4	Hexokinase und Glucokinase.....	5
1.4.1	Genstruktur und Regulation der Glucokinase	7
1.4.2	Das Glucokinaseregulatorische Protein.....	8
1.5	Gentechnisch veränderte insulinproduzierende Surrogatzellen für die Therapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus	9
1.5.1	Permanente insulinproduzierende Zelllinien	11
1.5.2	Insulinproduzierende Surrogatzellen auf der Basis neuroendokriner Zelllinien	12
1.6	Insulinproduzierende Gewebekulturzelllinie RINm5F	13
1.7	Die diabetogenen Substanzen Alloxan und Streptozotocin.....	14
1.7.1	B-Zelltoxische Wirkung von Alloxan	14
1.7.2	B-Zelltoxische Wirkung von Streptozotocin.....	16
1.8	Fragestellungen	19
2	Materialien und Methoden	21
2.1	Materialien	21
2.2	Subklonierungen von Glucokinase- und GLUT2-cDNA in eukaryontische Expressionsvektoren	26
2.2.1	Der eukaryontische Expressionsvektor pcDNA3.....	26
2.2.2	PCR-Amplifikation	28
2.2.3	Restriktionsverdau der Glucokinase-cDNA-und GLUT2-Amplifikationsprodukte und des Expressionsvektors pcDNA3 mit den Restriktionsenzymen <i>EcoRI</i> und <i>KpnI</i>	30
2.2.4	Dephosphorylierung der kohäsiven Enden des pcDNA3-Expressionsvektors	31
2.2.5	Ligation der Glucokinase- und GLUT2-cDNA-Fragmente in den pcDNA3-Expressionsvektor	31
2.2.6	Transformation des Ligationsansatzes in <i>E. coli</i> -JM109-Bakterien durch Elektroporation.....	32
2.2.7	Minipräparation von Plasmid-DNA	34
2.2.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	35
2.2.9	Restriktionsschnittanalyse der Vektoren pcDNA3-GK und pcDNA3-GLUT2	35
2.2.10	DNA-Minigelelektrophorese.....	36

2.2.11	Sequenzanalyse der Plasmide pcDNA3-GK und pcDNA3-GLUT2	36
2.2.12	Maxipräparation der Plasmide pcDNA3-GK und pcDNA3-GLUT2.....	39
2.3	Gewebekultur von RINm5F-Zellen.....	41
2.3.1	Zellpassagierung.....	41
2.3.2	Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometer	42
2.3.3	Kryokonservierung und Auftauen von eingefrorenen RINm5F-Zellen	42
2.4	Stabile Transfektion von RINm5F-Zellen	43
2.4.1	Linearisierung der Expressionsvektoren	43
2.4.2	Liposomale Transfektion.....	44
2.4.3	Selektion G418-resistenter RINm5F-Zellklone.....	45
2.5	Northern-Blot-Analyse.....	45
2.5.1	RNA-Isolierung.....	46
2.5.2	Gelelektrophorese zur Auftrennung der RNA.....	47
2.5.3	Herstellung DIG markierter <i>Antisense</i> -RNA-Sequenzen	48
2.5.4	<i>Northern-Blot</i> -Transfer	50
2.5.5	<i>Northern-Blot</i> -Hybridisierung.....	51
2.6	Western-Blot-Analyse.....	54
2.6.1	Herstellung von Zellextrakten	54
2.6.2	Isolierung von mikrosomalen Membranfraktionen	55
2.6.3	Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Assay.....	56
2.6.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	57
2.6.5	<i>Western-Blot</i> -Transfer	58
2.6.6	<i>Western-Blot</i> -Hybridisierung	59
2.7	Messung der Glucokinase-Enzymaktivitäten von Zellhomogenaten	60
2.8	Glucoseoxidation in RINm5F-Zellen.....	62
2.9	Glucoseaufnahme in RINm5F-Zellen	62
2.10	Insulinsekretion und Insulingehalt von RINm5F-Zellen	63
2.11	Insulin-Radioimmunoassay.....	64
2.12	Fluorometrische Quantifizierung von DNA aus RINm5F-Zellen	65
2.13	Implantation von RINm5F-GK-Zellen in <i>RNU</i>- und <i>NZNU</i>-Ratten.....	66
2.13.1	Haltung der Versuchstiere.....	66
2.13.2	Messung von Blutglucose und Körpergewicht implantierter <i>RNU</i> - und <i>NZNU</i> -Ratten.....	67
2.13.3	Induktion eines Diabetes mellitus bei <i>RNU</i> - und <i>NZNU</i> -Ratten durch Streptozotocin und Implantation von RINm5F-GK-Zellen.....	68

2.13.4	Glucosebelastung von implantierten <i>RNU</i> - und <i>NZNU</i> -Ratten durch orale Glucosegaben	68
2.13.5	Explantation von RINm5F-GK-Zellen aus <i>RNU</i> - und <i>NZNU</i> -Ratten	68
2.14	Digitoninpermeabilisierung von RINm5F-GK-Zellen hoher Passage	68
2.15	Inaktivierung von Eluaten permeabilisierter RINm5F-GK-Zellen durch Hitze und proteolytischen Verdau	69
2.16	Inkubationen von RINm5F-GLUT2-Zellen hoher Passage mit Alloxan und Streptozotocin	70
2.17	MTT-Vitalitätstest	71
2.18	Statistische Auswertung	72
3	Resultate	73
3.1	Charakterisierung von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen niedriger Passage	73
3.1.1	Nachweis der Genexpression von Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter in transfizierten RINm5F-Zellen niedriger Passage	74
3.1.2	Glucosephosphorylierung von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen niedriger Passage	79
3.1.3	Glucoseoxidation von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen niedriger Passage	81
3.1.4	3-O-Methyl[1- ³ H]-Glucose-Aufnahme von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen niedriger Passage.....	82
3.1.5	RT-PCR-Analyse der KIR6.2- und SUR1-Expression in RINm5F-Zellen niedriger Passage	84
3.1.6	Glucoseinduzierte Insulinsekretion und Insulingehalt von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen niedriger Passage.....	86
3.2	Implantation von RINm5F-GK-Surrogatzellen in diabetische immundefiziente Ratten ...	89
3.2.1	Blutglucose- und Gewichtsverlauf diabetischer immundefizienter Ratten nach Implantation von RINm5F-GK-Surrogatzellen.....	90
3.2.2	Proliferationscharakteristika von RINm5F-GK-Surrogatzellen und RINm5F-Zellen unter Gewebekulturbedingungen	93
3.2.3	Orale Glucosebelastung diabetischer immundefizienter Ratten nach Implantation von RINm5F-GK-Surrogatzellen und RINm5F-Kontrollzellen.....	93
3.2.4	Stabilität der Glucokinase-, GLUT2-Glucosetransporter- und Insulin-Genexpression von RINm5F-GK-Zellen unter <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Bedingungen	95
3.3	Charakterisierung von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage	96
3.3.1	Nachweis der Genexpression von Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter in transfizierten RINm5F-Zellen hoher Passage.....	97
3.3.2	Glucosephosphorylierung von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage	102

3.3.3	Glucoseoxidation von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage	104
3.3.4	3-O-Methyl[1- ³ H]-Glucose-Aufnahme von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage.....	105
3.3.5	Glucoseinduzierte Insulinsekretion und Insulingehalt von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage.....	107
3.4	Untersuchungen zur Regulation der Glucokinase-Enzymaktivität in Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage.....	109
3.4.1	Glucokinase- und Hexokinaseaktivitäten nach Freisetzung aus RINm5F-GK Zellen durch Digitonin	109
3.4.2	Glucokinaseaktivität in Abhängigkeit von der Proteinfreisetzung aus RINm5F-GK-Zellen unter dem Einfluß steigender Digitonin-konzentration.....	111
3.4.3	Regulation der intrazellulären Glucokinaseaktivität in insulinproduzierenden RINm5F-GK Zellen	112
3.4.4	Regulation der Glucokinase in insulinproduzierenden RINm5F-GK-Zellen durch einen spezifischen Proteinfaktor	115
3.5	Effekt einer GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression auf die Zytotoxizität der diabetogenen Noxen Alloxan und Streptozotocin bei RINm5F-Zellen hoher Passage	117
3.5.1	Schädigung von RINm5F-GLUT2-Zellen durch Alloxan und Streptozotocin	117
3.5.2	Schutz von Glucose vor einer Schädigung von RINm5F-GLUT2-Zellen durch Alloxan und Streptozotocin.....	120
3.5.3	Einfluß von Alloxan und Streptozotocin auf den Glucosetransport von RINm5F-GLUT2-Zellen	122
4	Diskussion.....	127
4.1	Bedeutung von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter für die glucoseinduzierte Insulinsekretion von RINm5F-Zellen	127
4.2	Implantation von RINm5F-GK-Surrogatzellen in diabetische immundefiziente Ratten .	132
4.3	Untersuchungen zur Regulation der Glucokinase-Enzymaktivität in Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage.....	134
4.4	Effekt einer GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression auf die Zytotoxizität der diabetogenen Noxen Alloxan und Streptozotocin bei RINm5F-Zellen hoher Passage	137
5	Zusammenfassung	140
6	Literaturverzeichnis	143

Abkürzungsverzeichnis

#	Passagennummer
%	Prozent
λ	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
μm	Mikromol
^{35}S -dATP	^{35}S markiertes Desoxyadenosintriphosphat
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bichinolin, 4,4'-dicarbonsäure
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<i>CIAP</i>	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
cm	Zentimeter
cm^3	Kubikzentimeter
CMV	Zytomegalievirus
<i>cpm</i>	<i>counts per minute</i>
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CTP	Cytidintriphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ddATP	2',3'-Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	2',3'-Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	2',3'-Didesoxyguanosintriphosphat
ddH ₂ O	zweimal destilliertes Wasser
ddTTP	2',3'-Didesoxythymidintriphosphat
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-Dextran
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
<i>DIG</i>	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	halbmaximale Konzentration
<i>ECL</i>	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
GTC	Guanidiniumthiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HBSS	Hanks' gepufferte Salzlösung
HEPES	4-(-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IDDM	insulinpflichtiger Diabetes mellitus
IgG	Immunglobulin
k	Reaktionskonstante
kb	Kilobasenpaare

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KR-Puffer	Krebs-Ringer-Puffer
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	molar
mA	Milliampere
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
ms	Millisekunden
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid
N	Normal
n.d.	nicht detektierbar
NAD	Nicotinamid-Adenosindinukleotid oxidiert
NADH	Nicotinamid-Adenosindinukleotid reduziert
NADP	Nicotinamid-Adenosindinukleotidphosphat oxidiert
NADPH	Nicotinamid-Adenosindinukleotidphosphat reduziert
ng	Nanogramm
NIDDM	nicht-insulinpflichtiger Diabetes mellitus
nm	Nanometer
nM	nanomolar
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonooxid

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>ob</i>	<i>obese</i> (fettleibig)
OD	optische Dichte
Orange G	8-(Benzolazo)-7-hydroxy-1,3-naphthalindisulfonsäure
P	Partialdruck
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pK _a	negativer Logarithmus der Säuredissoziationskonstante
pmol	pikomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidinfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPMI-1640	Kulturmedium
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Konstante
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler der Mittelwerte (<i>standard error of means</i>)
SOC	Medium
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(-hydroxymethyl)-aminomethan

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

t-RNA	Transfer-RNA
TTP	Thymintriphosphat
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurinat 20 %
U	Unit
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteile bezogen auf das Gesamtvolumen
W	Watt
w/v	Gewichtsanteile bezogen auf das Gesamtvolumen

1 Einleitung

1.1 Insulin und Diabetes mellitus

Das Peptidhormon Insulin ist für die Glucosehomöostase von zentraler Bedeutung. Insulin vermag durch eine Steigerung des Glucoseverbrauchs in der Muskulatur und einer Unterdrückung der Glykogenolyse und der Gluconeogenese in der Leber sowie der Lipolyse im Fettgewebe die Blutglucosekonzentration zu senken. Damit antagonisiert es die blutzuckersteigernden Effekte der Hormone Glucagon, Adrenalin, Kortisol und des Wachstumshormons. Insulin wird in den B-Zellen des Pankreas gebildet, die 2-5 % der Gesamtmasse des Organs ausmachen.

Ein Mißverhältnis zwischen Insulinbedarf und Insulinproduktion manifestiert sich als Diabetes mellitus, der mit einem Anteil von über 3 % der Bevölkerung häufigsten Stoffwechselerkrankung. Beim Diabetes mellitus werden im wesentlichen zwei Formen unterschieden: Beim Typ-I-Diabetes kommt es zu einer spezifischen Autoimmunzerstörung der insulinsezernierenden B-Zellen des Pankreas, die im Kindesalter bis zum frühen Erwachsenenalter zu einem nahezu vollständigen Verlust der B-Zellmasse und somit einem absoluten Insulinmangel führt. Als Ursache werden eine genetische Prädisposition in Interaktion mit Umweltfaktoren wie allergenen Nahrungsbestandteilen und viralen Infektionen als Pathomechanismen diskutiert.

Der Typ-IIa-Diabetes ist nicht die Folge einer verminderten Insulinsekretion, sondern primär einer Insulinresistenz der Zielorgane. Die verminderte Insulinwirkung kann durch eine Abnahme von Insulinrezeptoren und Postrezeptordefekten hervorgerufen werden. Dem Typ-IIb-Diabetes oder Altersdiabetes liegt ein Insulinmangel zugrunde, bei dem die B-Zellen des Pankreas nicht mehr in der Lage sind, auf einen Stimulus mit der Freisetzung einer adäquaten Insulinmenge zu reagieren.

1.2 Glucoseinduzierte Insulinsekretion

Unter physiologischen Bedingungen wird der Blutzucker in einem relativ engen Bereich von 4-8 mmol/l reguliert. Die B-Zelle des Pankreas muß daher in der Lage sein, (1) geringe Änderungen der Blutglucosekonzentration sensitiv zu erfassen, (2) auf diese Änderungen mit einer entsprechenden Sekretion von Insulin zu reagieren und (3) die Biosynthese von Insulin an den Bedarf der Sekretion anzupassen.

Das Signal für die Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion entsteht im Stoffwechsel der B-Zelle des Pankreas (Abb. 1) (Meglasson & Matschinsky 1986; Lenzen & Panten 1988b; Lenzen *et al.* 1990; Lenzen 1992b). Für die Kopplung von extrazellulären millimolaren Glucosekonzentrationen an den Stoffwechsel der B-Zelle spielen zwei Strukturen eine besondere Rolle:

- der niedrigaffine Glucosetransporter GLUT2 (Bell *et al.* 1990; Kayano *et al.* 1990; Unger 1991; Thorens *et al.* 1992; Lenzen & Tiedge 1994) und
- das niedrigaffine glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase (Meglasson & Matschinsky 1984; Meglasson & Matschinsky 1986; Lenzen & Panten 1988b; Lenzen 1992a; Iynedjian 1993; Matschinsky *et al.* 1993).

Die K_m -Werte beider Strukturen für Glucose liegen im millimolaren Konzentrationsbereich und stellen somit das ideale Kopplungsglied an den Stoffwechsel der pankreatischen B-Zelle dar. Nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung liegt folgender Mechanismus der Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion zugrunde (Lenzen 1992a; Efrat *et al.* 1994):

Glucose, die extrazellulär in millimolaren Konzentrationen vorliegt, gelangt auf dem Weg der erleichterten Diffusion gemäß des Konzentrationsgradienten durch den GLUT2-Glucosetransporter in die Zellen. Dort wird die Glucose im ersten Schritt der Glykolyse durch das niedrigaffine glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase (Hexokinase Typ IV) phosphoryliert. Kinetische Studien haben gezeigt, daß die Glucosephosphorylierung und nicht der Glucosetransport in die B-Zelle der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Glucosemetabolismus ist (Lenzen & Panten 1988b). Im Stoffwechselfluß der Glykolyse, des Citratzyklus und der Atmungskette werden ATP

und NADPH generiert, welche den ATP/ADP-Quotienten in der B-Zelle erhöhen. Das veränderte ATP/ADP-Verhältnis führt zum Verschluß des ATP-sensitiven Kaliumkanals, einem Proteinkomplex, der aus dem Sulfonylharnstoffrezeptor SUR1 und dem eigentlichen Kanalprotein KIR6.2 besteht. Die folgende Depolarisation der Plasmamembran führt zu einer Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Der hierdurch verursachte Einstrom von Calciumionen leitet die Exozytose der Insulingranula ein.

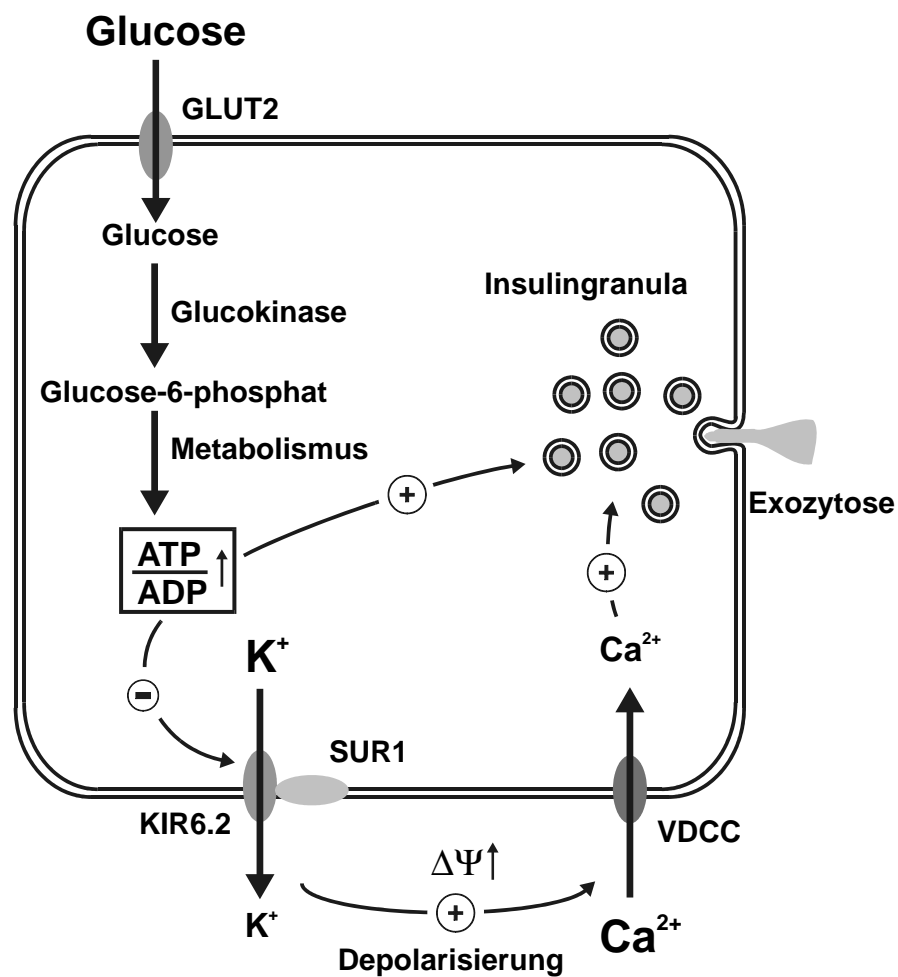


Abb. 1.1: Modell des Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion in der B-Zelle des Pankreas

1.3 GLUT2-Glucosetransporter

Der in der pankreatischen B-Zelle exprimierte GLUT2-Glucosetransporter gehört zur Familie der Säugetierglucosetransporter, die Glucose entlang eines Konzentrationsgradienten durch erleichterte Diffusion transportieren (Bell *et al.* 1990; Thorens *et al.* 1990a; Bell *et al.* 1991; Thorens 1992; Thorens *et al.* 1992; Bell *et al.* 1993). Bei allen bislang bekannten Glucosetransportersubtypen GLUT1 - GLUT7 dieser Transporterfamilie liegt die gleiche aus 12 transmembranalen Helices bestehende Grundstruktur vor. Trotz hoch konservierter Aminosäuresequenzen und den Gemeinsamkeiten in der Struktur sind die gewebespezifische und subzelluläre Expression sowie die kinetischen Charakteristika der bislang beschriebenen Isoformen sehr verschieden. Der GLUT2-Glucosetransporter unterscheidet sich von den anderen Isoformen durch folgende Charakteristika:

- einen hohen K_m -Wert für Glucose von 17 mM
- eine hohe Transportkapazität für Glucose im millimolaren Konzentrationsbereich
- die Expression in Geweben, die Glucose in millimolaren Konzentrationen resorbieren und verstoffwechseln müssen:
 - Leber,
 - B-Zelle des Pankreas,
 - Dünndarm,
 - Niere.

Studien an verschiedenen Tiermodellen des nicht-insulinpflichtigen Diabetes mellitus haben gezeigt, daß die GLUT2-Expression in den B-Zellen dieser Tiere drastisch erniedrigt war (Johnson *et al.* 1990; Orci *et al.* 1990a; Orci *et al.* 1990b; Unger 1991; Chen *et al.* 1992; Brant *et al.* 1993; Ohneda *et al.* 1993; Ohneda *et al.* 1994; Thorens & Roduit 1994). Ferner konnte in Studien an transgenen *knockout*-Mäusen klar belegt werden, daß eine Ausschaltung des GLUT2-Glucosetransporters mit einer schweren diabetischen Stoffwechsellage einhergeht und somit für die Funktion der pankreatischen B-Zelle von essentieller Bedeutung ist (Jorns *et al.* 1996; Guillam *et al.* 1997). Alle bislang vorliegenden Studien stützen den Schluß, daß nur eine gleichzeitige Expression des GLUT2-Glucosetransporters in der B-Zelle des Pankreas zusammen mit der Gluco-

kinase einen einwandfreien Glucose-Erkennungsapparat darstellen (Lenzen & Panten 1988b), obwohl kinetische Untersuchungen belegen, daß die Glucosetransportkapazität in der normalen B-Zelle des Pankreas um den Faktor 50-100 größer ist als die Glucose-phosphorylierungskapazität der Glucokinase (Tal *et al.* 1992; Heimberg *et al.* 1993). Hypothesen, die eine Interaktion zwischen dem GLUT2-Glucosetransporter und der Glucokinase postulieren, haben bislang keine stichhaltigen Resultate erbracht (Hughes *et al.* 1993).

1.4 Hexokinase und Glucokinase

Der erste Schritt des Glucosemetabolismus in eukaryontischen Zellen ist der Transfer einer Phosphatgruppe des ATP auf die 6-Hydroxylgruppe des Glucosemoleküls. Diese Reaktion wird durch eine Gruppe von strukturell verwandten Hexose-Phosphotransferasen katalysiert, die neben unterschiedlichen Molekulargewichten auch unterschiedliche kinetische Eigenschaften und gewebespezifische Expressionen zeigen. Sie können in zwei Gruppen unterteilt werden. Zur ersten Gruppe gehören die Hexokinase-Isoenzyme I-III. Diese Enzyme haben ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa und eine hohe Affinität für das Substrat Glucose mit K_m -Werten im Bereich von 20-130 μ M. Sie zeichnen sich durch eine *Feedback*-Hemmung physiologischer Konzentrationen von Glucose-6-phosphat aus (Middleton 1990).

Die zweite Gruppe ist durch die Hexokinase Typ IV oder Glucokinase (EC 2.7.1.2) repräsentiert, die ein deutlich geringeres Molekulargewicht von ca. 52 kDa und einen K_m -Wert für Glucose von ca. 10 mM besitzt (Lenzen & Panten 1988b; Lenzen 1990; Matschinsky 1990; Lenzen 1992a; Iynedjian 1993; Printz *et al.* 1993). Untersuchungen an der Glucokinase der Ratte zeigten, daß α -Anomere der Hexosen gegenüber β -Anomeren bevorzugt umgesetzt werden (Lenzen *et al.* 1987a). Der Name Glucokinase ist historisch auf die Selektivität für das Substrat Glucose zurückzuführen. Er trifft die kinetischen Eigenschaften des Enzyms nicht exakt, da die Hexosen D-Mannose (80 %), D-Fructose (20 %) und D-2-Deoxyglucose (40 % des V_{max} -Wertes von D-Glucose der Rattenleber-Glucokinase) ebenfalls von der Glucokinase phosphoryliert werden, wenn auch mit deutlich geringerer katalytischer Aktivität (Printz *et al.* 1993; Tiedge *et al.* 1997). Die Glucokinase zeigt eine kooperative Reaktionskinetik für das Substrat Glu-

cose mit einem Hill-Koeffizienten von $n = 1,5-1,7$ und einem entsprechenden sigmoidalen Reaktionsverlauf (Lenzen 1992a; Printz *et al.* 1993; Tiedge *et al.* 1997). Der Umkehrpunkt der sigmoidalen Aktivitätskurve liegt im Bereich von 5 mM Glucose und damit nahe an der Schwelle der B-Zelle des Pankreas für die Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion. Die positive Kooperativität führt dazu, daß selbst geringe Anstiege des Blutglucosespiegels im Fastenzustand über 5 mM eine drastischere Zunahme der Glucosephosphorylierung bewirken, als dies bei einer regulären Michaelis-Menten-Kinetik zu erwarten wäre (Matschinsky *et al.* 1993). Im Unterschied zu den Hexokinasen Typ I-III wird die Glucokinase nicht durch physiologische Konzentrationen von Glucose-6-phosphat gehemmt (Lenzen 1992a).

Die Glucokinase wird in zytoplasmatischer subzellulärer Lokalisation in den B-Zellen des Pankreas und der Leber sowie einigen seltenen endokrinen Zellen des Darms und des Gehirns exprimiert (Jetton *et al.* 1994). Die beschriebenen enzymkinetischen Eigenschaften der Glucokinase machen es zum idealen Signalerkennungsenzym für die Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion der pankreatischen B-Zelle. Studien an transgenen *knockout*-Mäusen konnten belegen, daß eine Ausschaltung der Glucokinase in der B-Zelle des Pankreas eine diabetische Stoffwechsellage induziert (Bali *et al.* 1995; Grupe *et al.* 1995).

Die Unterschiede zwischen Leber- und B-Zellglucokinase sind gering. Beide Proteine bestehen aus insgesamt 465 Aminosäuren, wobei sie an ihrem N-terminalen Ende in nur 11 Aminosäuren differieren (Magnuson & Shelton 1989). Die Unterschiede haben aber keinen Einfluß auf die enzymatischen Eigenschaften der Proteine.

Anhand der Kristallstruktur der Hefe-Glucokinase, zu der die humane Glucokinase eine 33 % Homologie aufweist, konnten Charles *et al.* 1994 ein dreidimensionales Modell der humanen Glucokinase erstellen. Das Enzym besteht demnach aus zwei Domänen, die eine geringe Längendifferenz aufweisen. Zwischen ihnen befindet sich eine tiefe Furche, die wie ein Winkel aufklappbar ist. An dessen Angelpunkt befindet sich das katalytische Zentrum. Es existieren zwei Konformationen der Glucokinase, bei denen die Größe des Winkels zwischen den beiden Domänen variiert. Bei der sogenannten geschlossenen Form ist er verkleinert, so daß der Zugang zum katalytischen Zentrum erschwert ist. Hierdurch werden die Reaktionsabläufe am katalytischen Zentrum von

anderen Stoffwechselfvorgängen in der Zelle abgeschirmt. Bei der offenen Form liegen die beiden Domänen wie aufgeklappt vor und präsentieren damit das katalytische Zentrum. Dies erleichtert die Bindung des Substrats.

1.4.1 Genstruktur und Regulation der Glucokinase

Die Genstrukturen der beiden Glucokinase-Isoformen der Leber und des Pankreas bestehen aus 10 Exons und zwei zusätzlichen Kontrollregionen. Die Exons 2-10 der Leber und der B-Zelle sind identisch. Das erste Exon ebenso wie die Promotoren liegen innerhalb der gewebespezifischen Kontrollregionen, welche mehr als 27 kb voneinander getrennt sind (Magnuson *et al.* 1989; Magnuson & Shelton 1989; Magnuson 1990). Während der Transkriptionsstartpunkt für die Leber-Glucokinase einen schmalen Bereich von nur sechs Basen aufweist und somit auf eine mögliche transkriptionelle Regulation hindeutet, erstreckt sich der Bereich für die B-Zell-Glucokinase auf 62 Basen (Magnuson & Shelton 1989). Die Transkriptionsinitiierung erfolgt am Leber-Promotor 127 kb von dem Translationsstartcodon entfernt, wohingegen die Transkriptionsinitiierung des B-Zell-Glucokinasegens 400 kb von dem Translationsstartcodon entfernt erfolgt (Magnuson *et al.* 1989; Magnuson & Shelton 1989).

In der Leber nehmen die Hormone Glucagon und Insulin Einfluß auf die Genexpression der Glucokinase (Iynedjian 1993). Insulin wirkt stimulierend und Glucagon antagonistisch auf die Transkriptionsrate. So bewirkt zum Beispiel eine 48stündige Fastenperiode eine Senkung der Transkriptionsrate um mehr als 97 % (Tiedge & Lenzen 1995), wohingegen auf eine exogene Insulingabe eine deutliche Induktion innerhalb von 4 Stunden erfolgt (Iynedjian *et al.* 1989). Veränderungen der Glucosekonzentration spielen keine Rolle in der Regulation der Glucokinase-Genexpression (Matsuda *et al.* 1990).

Dies ist der entscheidende Unterschied im Vergleich zur Genexpression der Glucokinase in der B-Zelle des Pankreas. Glucose stimuliert hier die Genexpression der Glucokinase. Zwar unterliegt die B-Zell-Glucokinase auch der Regulation über den Ernährungsstatus, diese ist aber deutlich schwächer als in der Leber ausgeprägt (Tiedge & Lenzen 1991). Desweiteren beeinflusst Insulin die Genexpression der Glucokinase in pankreatischen B-Zellen nicht (Tiedge & Lenzen 1995). Glucose wirkt nicht nur stimulierend auf die Glucokinase-Genexpression, sondern auch über einen kurz-

fristigeren direkten Effekt auf die Enzymaktivität. Diese Induktion der Glucokinase-Enzymaktivität verläuft in zwei Phasen (Chen *et al.* 1994). Innerhalb von 6 Stunden nach Inkubation von Pankreasinseln der Ratte bei hohen Glucosekonzentrationen nimmt der V_{\max} -Wert der Glucokinase um 50 % zu, wohingegen die Proteinmenge und die Affinität der Glucokinase zu Glucose unbeeinflusst bleiben (Chen *et al.* 1994). Im Verlauf steigt dann anschließend die Proteinmenge um 40 %.

Inhibitoren der Glucokinaseaktivität wirken ebenfalls meist direkt am Enzym. Dazu gehören die aufgrund ihrer Struktur durch Glucokinase nicht phosphorylierbaren Zucker D-Mannoheptulose und 3-O-Methylglucose. Sie konkurrieren mit den Substraten um das katalytische Zentrum der Glucokinase und wirken somit kompetitiv hemmend (Lenzen 1992a). Folglich führen sie auch zu einer Inhibierung der Insulinsekretion, wobei D-Mannoheptulose ein hochspezifischer Inhibitor der Glucokinase ist. Die Bindung findet im millimolaren Konzentrationsbereich statt und verändert den K_m -Wert der Glucokinase, ohne den V_{\max} -Wert zu beeinflussen.

Desweiteren ist die Glucokinase-Enzymaktivität durch SH-Gruppen-Oxidantien wie zum Beispiel Alloxan und Ninhydrin inhibierbar (s. Abschnitt 1.7.1).

In der Leber wird die Glucokinase zusätzlich durch das Fructose-1- und Fructose-6-phosphat empfindliche Glucokinaseregulatorische Enzym reguliert (Van Schaftingen 1989b).

1.4.2 Das Glucokinaseregulatorische Protein

Das Glucokinaseregulatorische Protein, ein 68,5-kDa-Protein, wurde von Van Schaftingen 1989 in Hepatozyten entdeckt. Ausgangspunkt hierbei war die Beobachtung, daß nicht nur Glucose, sondern auch Fructose die Glucosephosphorylierung in Rattenhepatozyten stimuliert (Van Schaftingen 1989b). Dieser Effekt wird durch Fructose-1-phosphat vermittelt, welches in Hepatozyten sowohl aus Fructose als auch Sorbitol synthetisiert wird. Fructose-1-phosphat antagonisiert die Inhibierung der Glucokinase durch das Glucokinaseregulatorische Protein, wohingegen Fructose-6-phosphat diesen inhibierenden Effekt fördert (Van Schaftingen 1989b; Vandercammen & Van Schaftingen 1990). Hierbei unterstützt Fructose-6-phosphat die Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes, während Fructose-1-phosphat diese Komplexbildung verhindert (Vandercammen & Van Schaftingen 1990). Beide Phosphatester binden hierbei an das

Glucokinaseregulatorische Protein (Vandercammen *et al.* 1992). Bei der Glucosebereitstellung in der Leber durch Glycogenolyse und Gluconeogenese ist die Fructose-6-phosphat Konzentration erhöht, was zu einer vermehrten Inhibierung der glucoseverbrauchenden Glucokinase führt. Stattdessen ist sie bei einem Stoffwechselstatus mit vorwiegender Glucosephosphorylierung erniedrigt, was eine Aktivierung der Glucokinase begünstigt (Van Schaftingen 1995).

1.5 Gentechnisch veränderte insulinproduzierende Surrogatzellen für die Therapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus

In Analogie zur Transplantation von Organen wie Niere, Leber und Herz sollte die Transplantation von B-Zellen des Pankreas die Organfunktionsstörung des Diabetikers beheben können (Lacy 1993). Die postmortale Autolyse von Spenderpankreatata ist ein Haupthindernis sowohl für die Transplantation des ganzen Organs als auch für die Isolierung von vitalen Inseln, die anschließend transplantiert werden können. Beide Therapieansätze sind bereits in der klinischen Anwendung, wobei ein kompletter Verzicht auf eine zusätzliche Insulinsubstitution nur bei einem Teil der Patienten erreicht wird. Die nicht perfekte Übereinstimmung der Oberflächenantigene erlaubt eine Transplantation nur bei gleichzeitiger Immunsuppression, weshalb die meisten der in der Literatur bisher beschriebenen Fälle von Pankreastransplantationen in Kombination mit einer Nierentransplantation durchgeführt wurden (Sutherland 1993). Die dialysepflichtige Niereninsuffizienz reflektiert bei einem Diabetiker jedoch bereits den Zustand einer Spätkomplikation nach chronischer Hyperglykämie und kommt somit der Forderung einer grundlegenden Therapie des Diabetes mellitus nicht nach. Zudem würde bei einer Prävalenz des insulinpflichtigen Typ-1-Diabetes von 0,2-0,3 % die Anzahl der verfügbaren Spenderpankreatata für die Transplantation nicht ausreichen, wenn diese frühzeitig vor dem Auftreten von Spätschäden erfolgen soll.

Für die gentechnischen Strategien zur Erzeugung von Surrogatzellen zur Therapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus sind die Charakteristika der Ausgangszelle und die angestrebte Funktion der Zellen von wesentlicher Bedeutung. Der Differenzierungsgrad der Ausgangszellen im Vergleich zur normalen B-Zelle steht in direkter Beziehung zu der Funktion der bedarfsgerechten Insulinsekretion und dem Aufwand der gentechni-

schen Manipulationen. Im experimentellen Stadium werden derzeit verschiedene Strategien verfolgt:

1. **Generierung von Surrogatzellen aus insulinproduzierenden Gewebekulturzelllinien.** Diese Ausgangszellen, die von Tumorzellen des Pankreas abstammen, stellen im Hinblick auf die Anforderungen der biologischen Sicherheit und der Verfügbarkeit eine vielversprechende Alternative gegenüber isolierten Inselzellen anderer Spezies dar. Sie zeigen eine Transkription des Insulingens sowie eine der B-Zelle vergleichbare Insulinbiosynthese und Insulin-*Prozessing*. Die gentechnischen Veränderungen an diesen Zellen haben das Ziel, (a) die Insulinbiosynthese auf das Niveau der normalen B-Zelle auszurichten und (b) eine bedarfsgerechte Sekretion auf physiologische Glucosekonzentrationen durch Transfektion entsprechender zellulärer Signalproteine zu gewährleisten.
2. **Generierung von insulinproduzierenden Surrogatzellen aus Nicht-B-Zellen.** Das Insulingen sowie Gene, die zur Prozessierung des Prohormons notwendig sind, werden in Körperzellen des Patienten, wie z. B. Hautfibroblasten oder Muskelzellen, *ex vivo* unter Gewebekulturbedingungen eingeführt und anschließend reimplantiert. Der Vorteil für den Patienten liegt in der nicht erforderlichen Immunsuppression und dem Fehlen von B-zellspezifischen Oberflächenantigenen, wodurch eine Autoimmunzerstörung umgangen wird.
3. **B-Stammzellen als Basis für Surrogatzellen.** Von der Entwicklungsbiologie sowie von der Kenntnis tierexperimenteller Diabetesmodelle ist seit langem klar, daß eine Regeneration von B-Zellen aus Vorläuferzellen möglich ist. Experimentelle Strategien machen sich hierbei insbesondere die molekularen Grundlagen der B-Zelldifferenzierung auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren zu Nutze.
4. ***In vivo* Transfektion des Insulingens in Nicht-B-Zellen.** Experimentell wurde hierbei das Insulingen durch physikalische Methoden und virale Vektoren in Hepatozyten von Ratten und Mäusen eingeführt.

Im weiteren wird auf den Punkt 1, die Generierung von Surrogatzellen aus insulinproduzierenden Gewebekulturzelllinien, dem Ansatz, der in der vorliegenden Studie verfolgt wurde, näher eingegangen.

1.5.1 Permanente insulinproduzierende Zelllinien

Permanente insulinproduzierende Tumorzellen sind seit den 70er Jahren in der experimentellen Diabetologie etabliert (Lenzen & Tiedge 1994; Poitout *et al.* 1996). Sie sind im Vergleich zu Organen relativ anspruchslos, was die Immunisolation durch Verkapselung in semipermeablen Membransystemen, einem bioartificialen Pankreas, erleichtert. Der entscheidende Unterschied zwischen den meisten permanenten insulinproduzierenden Zelllinien und normalen B-Zellen des Pankreas liegt in dem Verlust der Glucoseresponsivität. Sie erkennen Glucose nicht erst im physiologischen millimolaren Bereich, sondern bereits bei unphysiologischen submillimolaren Konzentrationen (Lenzen & Tiedge 1994). Die Kopplung millimolarer Glucosekonzentrationen an den Metabolismus ist ein spezifisches Charakteristikum der B-Zelle, dem für die Strategien zur Generierung von insulinproduzierenden Surrogatzellen eine wichtige Bedeutung zukommt.

Insulinproduzierende Tumorzelllinien, wie z. B. die aus einem strahlungsinduzierten Tumor generierte Sublinie RINm5F (s. Abschnitt 1.6) (Gazdar *et al.* 1980; Bhatena *et al.* 1982), sind seit vielen Jahren in der experimentellen Diabetologie etabliert (Poitout *et al.* 1996). Obwohl diese Zellen als B-zellspezifische Charakteristik das Insulingen exprimieren und in der Lage sind, das Prohormon zu prozessieren, ist zum einen der Insulingehalt deutlich geringer als in normalen B-Zellen und zum anderen keine sekretorische Antwort auf einen Glucosestimulus möglich. Ursächlich für die fehlende Glucoseresponsivität der Insulinsekretion ist in der Mehrzahl der etablierten insulinproduzierenden Tumorzelllinien ein Defekt des Glucoseerkennungsapparates. Statt des GLUT2-Glucosetransporters und der niedrigaffinen Glucokinase wird die hochaffine Glucosetransporterisoform GLUT1 sowie das hochaffine glucosephosphorylierende Enzym Hexokinase exprimiert, die ihr Funktionsoptimum im submillimolaren Konzentrationsbereich haben (Hughes *et al.* 1992; Ishihara *et al.* 1993b; Tiedge *et al.* 1993b). Der Sekretionsdefekt kann also molekularbiologisch einem veränderten Expressionsmuster von charakterisierten Genen zugeordnet werden, die mit gentechnischen Methoden eine Korrektur erlauben. Zwar sind in den letzten Jahren permanente Insulinomzelllinien selektioniert worden, die eine verbesserte Glucoseresponsivität besitzen, die zugleich mit einer verbesserten Expression des GLUT2-Glucosetransporters und der

Glucokinase korreliert (Asfari *et al.* 1992; Efrat *et al.* 1993). Die permanente Haltung dieser Zellen erfordert jedoch zum einen Gewebekultursupplemente, wie z. B. Thiolverbindungen bei INS-1-Zellen (Asfari *et al.* 1992), die eine Implantation solcher Zellen in ein bioartifizielles Pankreas erschweren. Zum anderen entstammen einige glucoseresponsive Zelllinien, wie z. B. die β TC- und die MIN6-Zellen, viral-induzierten Pankreastumoren transgener Mäuse und sind somit aus Gründen der biologischen Sicherheit nach dem heutigen Kenntnisstand nicht zu Transplantationszwecken zu verwenden (D'Ambra *et al.* 1990; Miyazaki *et al.* 1990; Efrat *et al.* 1991; Knaack *et al.* 1994; Jetton *et al.* 1998).

Gewebekulturzellen lassen sich im Vergleich zu isolierten Pankreasinseln leicht kultivieren; sie bergen jedoch das Risiko einer permanenten Proliferation, die zu schweren Hypoglykämien nach der Implantation führen könnte. Gegenwärtig werden Zellverkapselungstechnologien entwickelt, die das Wachstum solcher Zellen inhibieren können. Alternativ könnte auch das Zellreservoir extern zugänglich gemacht werden, um bei Bedarf die Zellmasse zu variieren. Das gegenwärtige Repertoire an Verkapselungspolymeren läßt ohne Zweifel für die Zukunft Verbesserungen erwarten, die den Einsatz semipermeabler Membranen für eine langfristige Insulinersatztherapie möglich machen sollte.

1.5.2 Insulinproduzierende Surrogatzellen auf der Basis neuroendokriner Zelllinien

Neuroendokrine Gewebekulturzellen wurden experimentell als Ausgangszellen für die Expression des Insulins etabliert, da sie (1) einen Sekretionsapparat mit entsprechender Ausstattung an Prohormon prozessierenden Endoproteasen besitzen, (2) die Möglichkeit bieten, humanes Insulin in reiner Form zu exprimieren und (3) keine B-Zell-identischen Antigene aufweisen, die eine Autoimmunattacke nach Implantation in einen diabetischen Patienten provozieren könnten. Der Prototyp einer solchen Zelllinie ist die AtT20-Zelle, eine corticotrophe Hypophysenzelle murinen Ursprungs, die unter anderem ACTH sezerniert. Die Transfektion dieser AtT20-Zellen mit dem humanen Insulinsgen resultierte in der Biosynthese, einer Proinsulinprozessierung und Sekretion reifen humanen Insulins über den regulierten sekretorischen Pathway (Moore *et al.* 1983). Die gentechnisch veränderten AtT20ins-Zellen waren jedoch nicht in der Lage,

humanes Insulin bedarfsgerecht auf einen millimolaren Glucosestimulus hin zu sezernieren, da weder der GLUT2-Glucosetransporter noch die Glucokinase als Signalerkennungsstrukturen in der erforderlichen Konstellation exprimiert waren (Hughes *et al.* 1992). Die Überexpression des GLUT2-Glucosetransporters führte zu einer Glucoseresponsivität, die jedoch mit einer maximalen sekretorischen Antwort bei 50 μM Glucose weit vom physiologischen Glucoseerkennungsbereich der B-Zelle entfernt lag (Hughes *et al.* 1992). Der Grund für die Stimulierbarkeit im subphysiologischen Bereich lag in der niedrigen Glucokinase/Hexokinase-Ratio, die eine Kopplung der intrazellulären millimolaren Glucosekonzentrationen an den Metabolismus verhindert.

Die Implantation von AtT20ins-Zellen, die das humane Insulingen unter Kontrolle des Metallothioneinpromotors exprimieren, konnte in Mäusen die Entwicklung einer Hyperglykämie nach Behandlung mit Streptozotocin verzögern (Stewart *et al.* 1994). Interessanterweise entwickelte sich die Hyperglykämie trotz ausreichender Sekretion von humanem Insulin und konnte auch durch exogene Insulinzufuhr nicht verhindert werden. Die Erklärung für dieses Phänomen lag in erhöhten Glucocorticoidspiegeln, die Folge einer ACTH-Sekretion aus den corticotrophen AtT20-Zellen waren und eine Insulinresistenz induzierten (Docherty 1997). Dieses Beispiel belegt, daß neuroendokrine Zellen nur eingeschränkt für die Insulinsubstitution bei diabetischen Patienten eingesetzt werden können, solange nicht die Ko-Sekretion der hochaktiven Neuropeptide ausgeschaltet wird.

1.6 Insulinproduzierende Gewebekulturzelllinie RINm5F

Gazdar *et al.* gelang es 1980 durch hochdosierte Ganzkörper-Röntgenstrahlung von *NEDH*-Ratten (*Inbred New England Deaconess Hospital Rats*), einen transplantierbaren Inselzelltumor zu induzieren. Durch serielle Transplantationen in *NEDH*-Ratten und in immundefiziente thymuslose Mäuse wurden die Tumoren aufrechterhalten. Nach Explantation konnten Tumorzellen *in vitro* kultiviert und so die kontinuierlichen Gewebekulturzellen RINm und RINr etabliert werden. Die RINm-Zelllinie wurde durch Bhatnaga *et al.* (1982) und Oie *et al.* (1983) subkloniert. Die auf diese Weise gewonnenen Klone wurden in drei Gruppen eingeordnet: Insulinsezernierende Zellen, somato-

statinsezernierende Zellen und solche ohne Hormonsekretion. Der Subklon RINm5F zeigte eine stabile Insulinsekretion, jedoch keine nennenswerte Somatostatinfreisetzung. In den folgenden Jahren wurde die RINm5F-Zelllinie von zahlreichen Autoren charakterisiert (Lenzen & Tiedge 1994; Poitout *et al.* 1996) und konnte sich als Modell der pankreatischen B-Zelle für zahlreiche Fragestellungen etablieren. Der bedeutendste Unterschied von RINm5F-Zellen zur pankreatischen B-Zelle besteht in der fehlenden physiologischen glucoseinduzierten Insulinsekretion (Halban *et al.* 1983; Praz *et al.* 1983). Hauptursache hierfür ist das niedrige Glucokinase/Hexokinase-Verhältnis, durch das es nicht möglich ist, millimolare Glucosekonzentrationen an den Metabolismus zu koppeln (s. Abschnitt 1.2).

1.7 Die diabetogenen Substanzen Alloxan und Streptozotocin

Die diabetogenen Substanzen Alloxan und Streptozotocin sind schon seit langem in der experimentellen Diabetologie etabliert. Dabei dienen sie nicht nur zur Generierung diabetischer Tiermodelle, sondern auch zum Studium der molekularen Zellschädigungsmechanismen in der pankreatischen B-Zelle, wie sie bei der Manifestation eines Diabetes mellitus ablaufen.

1.7.1 B-Zelltoxische Wirkung von Alloxan

Alloxan (2,4,5,6-Tetraoxypyrimidin) ist seit über 50 Jahren als diabetogene Substanz bekannt, die nicht nur spezifisch die B-Zellen des Pankreas zerstört, sondern auch die glucoseinduzierte Insulinsekretion hemmt (Lenzen & Panten 1988a; Lenzen *et al.* 1990). Alloxan ist hydrophil und chemisch sehr instabil. Es zerfällt in wäßriger Lösung bei pH 7,4 und 37 °C mit einer Halbwertszeit von weniger als 2 min (Lenzen & Munday 1991).

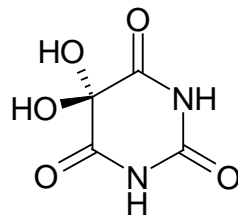


Abb. 1.2: Strukturformel von Alloxan

Als Ursache für die spezifische B-Zelltoxizität wird u. a. die selektive Aufnahme durch die B-Zelle gesehen. Hierfür spricht die sterische Ähnlichkeit des Alloxans zum Glucosemolekül und die Tatsache, daß 3-O-Methylglucose die glucoseinduzierte Insulinsekretion vor der Inhibierung durch Alloxan schützt (Tomita *et al.* 1974; Lenzen & Panten 1988a). Alloxan kann im Kontakt mit zellulären Systemen freie Sauerstoffradikale durch Redoxzyklen mit z. B. Glutathion generieren (Asayama *et al.* 1984; Lenzen & Munday 1991; Munday *et al.* 1993).

Alloxan ist in der Lage, effektiv proteingebundene Thiole zu oxidieren, was u. a. durch die selektive Hemmung des SH-Gruppen tragenden Enzyms Glucokinase deutlich wird. Untersuchungen an zytoplasmatischen Fraktionen der B-Zell-Glucokinase von Ratten ergaben EC_{50} -Konzentrationen im Bereich von 5 μ M, also um einen Faktor 1000 niedriger als die effektiven Konzentrationen kompetitiv hemmender Zucker (Lenzen *et al.* 1987b).

Der Mechanismus der Hemmung der Glucokinase-Enzymaktivität ist im Detail unklar. Es gibt jedoch Hinweise, daß die Oxidation von SH-Gruppen im Bereich der Glucosebindungsstelle durch die reaktive 5-CO-Gruppe des Alloxanmoleküls an der Hemmung der Enzymaktivität beteiligt sind, da:

- a) die metabolisierbaren Hexosen Glucose und Mannose sowie der kompetitive Inhibitor Mannoheptulose vor der Hemmung durch Alloxan schützen (Lenzen *et al.* 1987b),
- b) SH-Gruppen-protektive Substanzen wie Dithiothreitol und Glutathion vor der Hemmung durch Alloxan schützen, eine bereits erfolgte Hemmung reversibel machen und die Enzymaktivität wiederherstellen (Lenzen *et al.* 1987b; Lenzen *et al.* 1988a; Lenzen *et al.* 1988b; Lenzen *et al.* 1990),

c) der Ersatz des Cysteinresiduums C219, einer glucokinasespezifischen Aminosäure, welche in den anderen Hexokinase-Enzymen nicht vorkommt, die Empfindlichkeit der Leber-Glucokinase des Menschen gegenüber Alloxan stark vermindert (Lenzen *et al.* 1995, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Hexokinase der Leber und der B-Zelle des Pankreas zeigt eine 100fach geringere Empfindlichkeit gegenüber Alloxan und ist somit nicht als spezifischer Angriffspunkt dieser SH-Gruppen-reaktiven Substanz anzusehen (Lenzen *et al.* 1990).

1.7.2 B-Zelltoxische Wirkung von Streptozotocin

Streptozotocin (N-[Methylnitrosocarbamoyl]-D-glucosamin) wurde 1956 bei der Suche nach neuen Antibiotika aus dem Bodenbakterium *Streptomyces achromogenes* isoliert (Weiss 1982). Varva *et al.* konnten 1959 die antimikrobielle Wirkung gegen zahlreiche Organismen nachweisen. In den Jahren 1960 und 1961 wurde die Antitumorwirkung des Streptozotocins bei Screenings entdeckt und findet seit 1967 bei der Behandlung unterschiedlicher Tumoren insbesondere bei Inselzelltumoren Anwendung (White 1963; Weiss 1982). Bei vorklinischen toxikologischen Untersuchungen fiel schon 1962 die diabetogene Wirkung des Streptozotocins bei Ratten und Hunden auf, denen intravenös eine ausreichende Dosis der Substanz verabreicht wurde (Rakieten *et al.* 1963). Die Versuchstiere entwickelten nach 24 Stunden einen Diabetes mellitus mit den typischen Symptomen Polydipsie, Polyurie, Glucosurie, Ketonurie und Hyperglykämie.

Streptozotocin ist ein D-Glucopyranosederivat des N-Methyl-N-nitrosoharnstoffs. Die Substanz ist in wässriger Lösung bei neutralem pH instabil und zerfällt mit einer Halbwertszeit von 5-15 min (Weiss 1982).

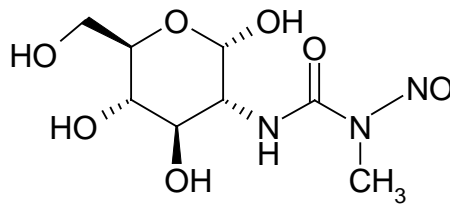


Abb. 1.3: Strukturformel von Streptozotocin

Als Zerfallsprodukte werden u. a. reaktive Methylcarboniumionen, die Proteine und DNA alkylieren können, gebildet (Bennett & Pegg 1981; Wilson *et al.* 1988). Durch die Alkylierung von Nukleotiden werden zahlreiche Strangbrüche in der DNA gesetzt (Yamamoto *et al.* 1981; LeDoux 1986). Dies führt zu einer Überaktivierung des Enzyms Poly(ADP-Ribose)-Polymerase und zu einem für die Zelle kritischen Mangel an NAD, der im Tod der Zelle enden kann (Wilson *et al.* 1988). Diese Hypothese konnte durch Studien an transgenen *knockout*-Mäusen, in denen das Gen für die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase deletiert ist, bestätigt werden. Die B-Zellen dieser transgenen Mäuse waren vor der Zerstörung durch Streptozotocin geschützt, so daß die Tiere keine Hyperglykämie entwickelten (Masutani *et al.* 1999; Pieper *et al.* 1999).

Obwohl die Alkylierungsaktivitäten von DNA durch Streptozotocin und *N*-methyl-*N*-nitrosoharnstoff in Nicht-B-Zellen vergleichbar sind, ist die Toxizität von Streptozotocin für B-Zellen um den Faktor zehn höher als für Nicht-B-Zellen (LeDoux 1986). Als Ursache hierfür wird eine selektive Aufnahme durch die B-Zelle diskutiert, die durch den Glucoseresst des Streptozotocinmoleküls ermöglicht wird (Ledoux & Wilson 1984; Schnedl *et al.* 1994). Diese Annahme ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß nach einer Streptozotocininjektion in Tieren oder Menschen die Substanz in der Leber, Niere und in den pankreatischen B-Zellen akkumuliert wird - Gewebe, in denen der GLUT2-Glucosetransporter exprimiert wird (Weiss 1982). In GLUT2-überexprimierenden Gewebekulturzellen konnte ebenfalls eine gesteigerte Aufnahme von Streptozotocin im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Schnedl *et al.* 1994).

Neben der zytotoxischen Wirkung des Streptozotocins, die auf der Alkylierung von Biomolekülen beruht, werden auch Zellschädigungsmechanismen diskutiert, an denen NO-Radikale beteiligt sind. Die NO-Radikale sollen dabei durch den Metabolismus der

Zellen nach Abspaltung der Nitrosylgruppe des Streptozotocins gebildet werden (Kroncke *et al.* 1995). So konnte an unterschiedlichen Geweben gezeigt werden, daß Streptozotocin durch das NO aktivierte Enzym Guanylatcyclase stimuliert wird und zu einer Akkumulation von cGMP führt (Craven & DeRubertis 1977; Vesely & Levey 1977; Turk *et al.* 1993). Eine Guanylcyclase-Aktivierung war hingegen bei Streptozotocinderivaten ohne Nitrosylgruppen nicht nachzuweisen (Vesely & Levey 1978).

1.8 Fragestellungen

Durch die Überexpression des glucosephosphorylierenden Enzyms Glucokinase und des GLUT2-Glucosetransporters in insulinproduzierenden RINm5F-Gewebekulturzellen sollten Fragen aus den Problemkreisen

- (1) der Generierung von Surrogatzellen für die Therapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus,
- (2) der Regulation der Glucokinase-Enzymaktivitäten in insulinproduzierenden Zellen und
- (3) der B-zelltoxischen Wirkung der diabetogenen Substanzen Alloxan und Streptozotocin

beantwortet werden.

Im einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

zu 1)

- a) Welchen Einfluß haben die Überexpression des glucosephosphorylierenden Enzyms Glucokinase und des GLUT2-Glucosetransporters auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion von RINm5F-Zellen?
- b) Können gentechnisch veränderte glucoseresponsive Surrogatzellen auf der Basis der Gewebekulturzelllinie RINm5F die Stoffwechsellage eines diabetischen Tieres nach Implantation verbessern?
- c) Ist eine glucosestimulierte Insulinsekretion der Surrogatzellen auch *in vivo* nachweisbar?

zu 2)

- a) Ist die Glucokinase in Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen ähnlich wie in Hepatozyten an intrazelluläre Strukturen gebunden?
- b) Kann die Enzymaktivität der Glucokinase durch eine mögliche Bindung reguliert werden?
- c) Welche Eigenschaften besitzt ein glucokinaseregulierender Faktor?

zu 3)

- a) Welche Auswirkungen hat eine Überexpression des GLUT2-Glucosetransporters in RINm5F-Zellen auf die Zytotoxizität von Alloxan und Streptozotocin?
- b) Welchen Einfluß haben Alloxan und Streptozotocin auf den Glucosetransport von GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen?
- c) Welches sind mögliche zelluläre Zielstrukturen der Alloxan- und Streptozotocintoxizität in insulinproduzierenden Zellen?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

[γ - ³³ P]-dATP	Hartmann, Braunschweig
0,24 – 9,5 kb RNA-Längenstandard	Gibco, Eggenheim
<i>1 kb DNA Ladder</i>	Gibco, Eggenheim
<i>10 kDa Protein Ladder</i> , 10-200 kDa	Gibco, Eggenheim
4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Boehringer, Mannheim
6-Aminohexansäure	Sigma, München
6-Aminohexansäure	Sigma, München
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	Boehringer, Mannheim
Acrylamid Lösung 40 %	GIBCO BRL, Eggenheim
Acrylamid:N,N'-methylenbisacrylamid 37,5:1 40%	Gibco, Eggenheim
Agarose, <i>low melting</i> -Qualität	FMC, Rockland, USA
Agarose, Standard-DNA-Qualität	Bio-Rad, München
Albumin (Fraktion V)	Miles, Elkhart, USA
alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Alloxan	Sigma, München
Ammoniumpersulfat	Gibco, Eggenheim
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, peroxidase-markiert	Dianova, Hamburg
Bakto-Trypton	Gibco, Eggenheim
Bakto-Yeast-Extrakt	Gibco, Eggenheim
BCA-Fertigreagenz	Pierce, Rockford, USA
Blotting Papier GB 003 und GB 002	Schleicher & Schüll, Dassel
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, München
Butanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
cDNA der humanen B-Zell-Glucokinase	Dr. M. A. Permutt, Washington, USA
cDNA des GLUT2-Glucosetransporters der Ratte	Dr. B. Thorens, Lausanne,

	Schweiz
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R 250	Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
D(+)-Mannose	Merck, Darmstadt
Deoxynukleotidtriphosphat	Promega, Mannheim
<i>DIG</i> Lumineszenz Detektions System	Boehringer, Mannheim
Digitonin	Sigma, München
D-Mannit	Serva, Heidelberg
DMSO	Sigma, München
dNTP-Mix (20 mM)	Promega, Heidelberg
DTT	Sigma, München
<i>ECL</i> -Chemilumineszenz Detektions System	Amersham, Braunschweig
EDTA	Sigma, München
Eisessig	Merck, Darmstadt
Elektroporationsküvetten, 2 mm Elektrodenabstand	Bio-Rad, München
Entwickler <i>LX 24</i>	Kodak, Rochester, USA
Ethanol	Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Pharmacia, Freiburg
Filterpapiere	Schleicher&Schuell, Dassel
Fixierer <i>AL 4</i>	Kodak, Rochester USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenheim
Fructose-6-phosphat	Boehringer, Mannheim
Geneticin (G418)	Gibco, Eggenheim
Glücksklee Magermilchpulver	Nestle AG, Frankfurt
Glucose	Merck, Darmstadt
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Sigma, München
Glycerol	Gibco, Eggenheim
Glyzin	Merck, Darmstadt
Guanidiniumthiocyanat (GTC)	Fluka, Buchs, Schweiz

Harnstoff	Gibco, Eggenheim
Hefe t-RNA	Boehringer, Mannheim
Hefeextrakt	Gibco, Eggenheim
HEPES	Sigma, München
Herings-DNA	Boehringer, Mannheim
HOE33342-Farbstoff	Molecular Probes, Eugene, USA
<i>Hybond N-Blotting-Membran</i>	Amersham, Braunschweig
<i>Hypercassette-Autoradiographie-Kassetten</i>	Amersham, Braunschweig
<i>Hyperfilm MP und Hyperfilm β-max</i>	Amersham, Braunschweig
<i>Hyperfilm β-max 30x40 cm</i>	Amersham, Braunschweig
<i>Hyperfilm-MP 18x24</i>	Amersham, Braunschweig
<i>Immobilon-P Transfer (PVDF-Membran)</i>	Millipore, Eschborn
Inslin-I ¹²⁵	Hoechst Marion Roussel, Frankfurt
IPTG	Biomol, Hamburg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Baker, Deventer, Niederlande
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
L(-)-Fructose	Merck, Darmstadt
Lipofectamin Transfektionsreagenz	Gibco, Eggenheim
Luria Agar	Gibco, Eggenheim
Lysozym	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Merck, Darmstadt
Mannose-6-phosphat	Boehringer, Mannheim
Menadion	Sigma, München
Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz

Methanol	Baker, Deventer, Niederlande
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Milchpulver	Nestle, Frankfurt
Mineralöl	Sigma, München
MTT	Serva, Heidelberg
Na-ATP	Boehringer, Mannheim
NADP	Boehringer, Mannheim
NADPH	Boehringer, Mannheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Riedel-de Häen, Seelze
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natrium-Laurylsarcosin	Sigma, München
Natriumthiosulfat	Sigma, München
Oligonukleotide (Auftragssynthese)	Pharmacia, Freiburg i.Br.
Oligonukleotide für Sequenzierzwecke	Gibco ,Eggenheim
Orange G	Sigma, München
<i>pBluescript SK+</i> -Klonierungsvektor	Stratagene, Heidelberg
<i>pcDNA3</i> -Expressionsvektor	Invitrogen, Leek, Niederlande
Phenol	Merck, Darmstadt
Phosphoglucose-Isomerase	Boehringer, Mannheim
Phosphomannose-Isomerase	Boehringer, Mannheim
Plastiklaborartikel	Sarstedt, Nürnberg
PMSF	Sigma, München
Polyethylenglykol 8000	Sigma, München
Ponceau S-Konzentrat	Sigma, München
PVP	Sigma, München
<i>Qia Express Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Qiagen Maxi Prep Kit</i>	Qiagen, Hilden

<i>Qiagen Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Qiagen PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim
Rinderalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
RINm5F-Zellen	ATTC, Rockville, USA
RNase/DNase-frei	Boehringer, Mannheim
<i>RNasin</i> Ribonuklease-Inhibitor	Promega, Mannheim
RPMI-1640 Medium	Gibco ,Eggenheim
Salzsäure	Riedel-de Häen, Seelze
SDS	Sigma, München
Select Pepton 140	Gibco ,Eggenheim
Sequenase DNA Sequencing Kit, Version 2.0	Amersham, Braunschweig
<i>Serdolit MB-2</i> Mischbettionenaustauscher	Serva, Heidelberg
Sofortbildfilm Typ 667	Polaroid, Cambridge, USA
SP6-RNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Spritzenvorfilter, steril, 0,2 µm Porengröße	Schleicher&Schuell, Dassel
Streptomycin/Penicillin	Gibco, Eggenheim
Streptozotocin	Sigma, München
Sucrose	Gibco, Eggenheim
Sulfanilamid	Sigma, München
T3-RNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Gibco, Eggenheim
T4-Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
<i>Taq</i> -Polymerase	Pharmacia, Freiburg i.Br.
TEMED	Gibco, Eggenheim
Tetracyclin	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, München
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma, München
Zellkulturgefäße (steriles Einwegmaterial)	Nunc, Wiesbaden

2.2 Subklonierungen von Glucokinase- und GLUT2-cDNA in eukaryontische Expressionsvektoren

Die cDNA der Pankreas-Isoform der menschlichen Glucokinase wurde freundlicherweise von Dr. M. A. Permutt, Washington School of Medicine, St. Louis, zur Verfügung gestellt. Die gesamte Glucokinase-cDNA war in den Klonierungsvektor pBluescriptSK+ (Stratagene, La Jolla, USA) subkloniert und enthält auch nicht-kodierende cDNA-Sequenzen am 5'- und 3'-Ende des Leserahmens.

Die cDNA des GLUT2-Glucosetransporters der Ratte wurde freundlicherweise von Dr. B. Thorens, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Lausanne, im Klonierungsvektor pGEM4 zur Verfügung gestellt.

Für die Expression der Glucokinase und des GLUT2-Glucosetransporters in eukaryontischen Gewebekulturzellen war die Subklonierung in ein spezielles eukaryontisches Expressionsplasmid erforderlich. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die kodierenden Bereiche und zusätzliche nicht kodierende Basen am 5'-Ende der cDNAs amplifiziert. Bei der PCR fanden Composite-Primer Anwendung, mit denen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonucleasen an den Enden des PCR-Fragmentes angebracht wurden. Durch die Wahl von Erkennungssequenzen für unterschiedliche Restriktionsenzyme am 5'- und 3'-Ende der PCR-Fragmente war nach einem Restriktionsverdau eine in der Orientierung der cDNA festgelegte Subklonierung in den Expressionsvektor möglich.

2.2.1 Der eukaryontische Expressionsvektor pcDNA3

Für den nicht-viralen Gentransfer sind Plasmide mit speziellen Strukturelementen für die Genexpression in Eukaryontenzellen notwendig. Da eine zu exprimierende cDNA als Abbild der mRNA keine regulatorischen Elemente zur Kontrolle der Genaktivität besitzt, muß der Expressionsvektor eine in der Wirtszelle wirksame *Promoter/enhancer*-DNA-Sequenz zur Verfügung stellen. Die *Promoter/enhancer*-Region ist für die Initiation der Transkription der cDNA erforderlich und dient als Startpunkt für die RNA-Polymerase II. Eine der cDNA folgende Polyadenylierungssequenz im Plasmid dient zur Termination der Transkription und zur Polyadenylierung der synthetisierten mRNA. Ein Resistenzgen eines in Eukaryonten

wirksamen Antibiotikums kann zur Selektion von stabil-transfizierten Zellklonen genutzt werden. Weitere Strukturelemente sind eine *Multiple cloning site* für eine einfache Subklonierung einer cDNA, ein prokaryontischer Replikationsursprung zur Vermehrung des Plasmids in *E. coli* und ein in Prokaryonten wirksames Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmidvektor pcDNA3 (Abb. 2.1) enthält den *Immediate-early promoter/enhancer* des humanen Zytomegalievirus, der eine hohe, konstitutive Genexpression in einer Vielzahl von unterschiedlichen Säugetierzellen erlaubt.

Stabil transformierte Zellklone können bei mit dem Plasmid pcDNA3 transfizierten Zellen durch Zugabe des Aminoglycosid-Antibiotikums G418 zum Nährmedium selektiert werden. G418 bindet spezifisch an die 80S-Ribosomen in eukaryontischen Zellen und blockiert damit die Proteinbiosynthese. Das Neomycin-Resistenzgen auf dem pcDNA3-Vektor codiert für eine Aminoglycosid-Phosphotransferase, die G418 durch Phosphorylierung deaktiviert.

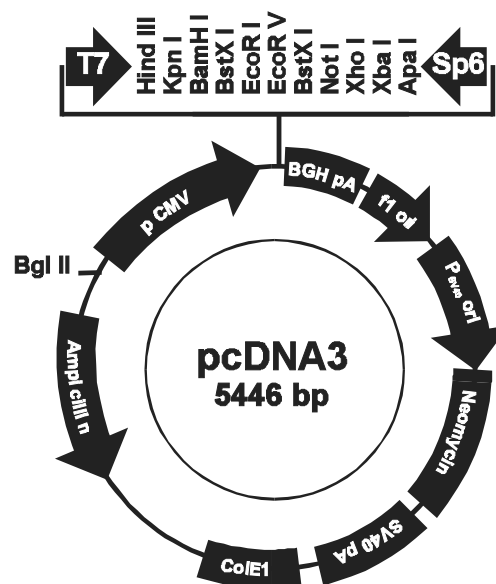


Abb. 2.1: Strukturelemente des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3

Bezeichnung	Strukturelement	Funktion
CMV	Humane Zytomegalievirus immediate-early promoter/enhancer	hohe Expression von rekombiniertem Protein in Säugetierzellen
MCS	Multiple Cloning Site	Einfügen des zu exprimierenden Gens
T7 / SP6	Promotor-Sequenz für die T7 bzw. SP6-RNA-Polymerase	in vitro Transkription des klonierten Gens
BGH	Polyadenylierungssignal des Rinderwachstumshormongens	Transkriptionstermination und Polyadenylierung von mRNA
f1 ori	f1 Replikationsursprung	Freisetzung von ssDNA
SV40 ori	SV40 early promoter und Replikationsursprung	hohe Expression des Neomycinresistenzgens und episomaler Replikationsursprung in Zellen, die das SV40 large T antigen exprimieren
Neomycin	Neomycin-Resistenzgen (Aminoglycosid-Phosphotransferase)	Selektion von stabilen Transfektanden in Säugetierzellen
SV40 pA	SV40 Polyadenylierungssignal	Transkriptionstermination und Polyadenylierung von mRNA
ColE1	ColE1 Replikationsursprung	Plasmid-Replikation in <i>E. coli</i>
Ampicillin	Ampicillin-Resistenzgen (β -Lactamase)	Selektion des Plasmids in <i>E. coli</i>

Tab. 2.1: Strukturelemente des pCDNA3 Vektors

2.2.2 PCR-Amplifikation

Der kodierende Bereich und zusätzliche 270 Basen am 5'-Ende der Glucokinase-cDNA der B-Zelle des Pankreas wurde mit *forward* und *reverse composite* Primern amplifiziert, die neben der kodierenden Glucokinase-cDNA-Sequenz am 5'-Ende die Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *KpnI* trugen. Zusätzlich wurden 5 Nukleotide randomisiert angefügt, um die Effizienz des Restriktionsschnitts zu erhöhen (White 1993). Die verwendeten Primer sind in Tab. 2.2 aufgeführt.

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz
GK-FOR	TACTCGGATCC <u>ATGCTGGACGACAGAGCCAG</u>
GK-REV	CGATTGGTACCTCTCACTGGCCCAGCATA <u>CA</u>

Tab. 2.2: Primer für PCR-Amplifikation der human Insel-Glucokinase-cDNA

Die unterstrichenen Nukleotide geben den kodierenden Bereich der *composite*-Primer an. Die Glucokinase-Sequenzen der Primer wurden nach Takeda *et al.* (1993) bestimmt.

Die Primer für die Amplifikation der GLUT2-cDNA wurden nach dem gleichen Prinzip wie bei der Glucokinase bestimmt. Der Bereich am nicht kodierenden 5'-Ende umfaßt jedoch 121 Basen vor dem ATG-Startcodon.

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz
GLUT2-FOR	TACTCGGATCC <u>GATGCAAATGCAATAGG</u>
GLUT2-REV	CGATTGGTACCAATCGTGAGTTTAGCTG

Tab. 2.3: Primer für PCR-Amplifikation der Ratten-GLUT2-cDNA

Die unterstrichenen Nukleotide geben den kodierenden Bereich der *composite*-Primer an. Die GLUT2-cDNA-Sequenzen der Primer wurden nach Thorens *et al.* (1992) bestimmt.

Die Amplifikation des Glucokinase-cDNA- und des GLUT2-cDNA-Fragments wurde unter Verwendung der *Full-length*-Klonierungsvektoren als *Template* (= Matrize) in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

10 µl	10x <i>Taq</i> -Reaktionspuffer
1 µl	dNTP-Mix 20 mM
0,5 µl	Primer 1 FOR, 100 pmol
0,5 µl	Primer 2 REV, 100 pmol
77,7 µl	steriles bidest. Wasser <i>ad</i> 100 µl
0,5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (2 U/µl)
10 µl	Plasmid (pBlueskriptSK-IGk2. oder pGEM4GLUT2 jeweils 10 ng/µl)

10x *Taq*-Reaktionspuffer: 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl (pH 9)

Nach Überschichtung mit 50 μ l Mineralöl wurde eine PCR-Amplifikation in einem programmierbaren Thermoblock (Uno Thermoblock, Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt:

94 °C, 4 min initiale Denaturierung	
93 °C, 90 s	15 Zyklen
60 °C, 1 min	
72 °C, 90 s	
72 °C, 5 min Endextension	

Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarose-TBE-Gel analysiert, mit einem *PCR Purifikation Kit* (Qiagen) über eine Silica-Säule aufgereinigt und in 50 μ l TE-Puffer eluiert.

2.2.3 Restriktionsverdau der Glucokinase-cDNA- und GLUT2-Amplifikationsprodukte und des Expressionsvektors pcDNA3 mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *KpnI*

Der Restriktionsverdau wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *KpnI* im Reaktionspuffer B durchgeführt.

Glucokinase- oder GLUT2-cDNA:

12 μ l	steriles bidest. Wasser <i>ad</i> 30 μ l
1 μ l	Reaktionspuffer B (Fermentas)
15 μ l	2-3 μ g GK- oder GLUT2-cDNA-PCR-Produkt
1 μ l	Restriktionsenzym <i>EcoRI</i> (10 U/ μ l)
1 μ l	Restriktionsenzym <i>KpnI</i> (10 U/ μ l)

pcDNA3-Plasmid:

17 μ l	steriles bidest. Wasser <i>ad.</i> 30 μ l
1 μ l	Reaktionspuffer B (Fermentas)
10 μ l	pcDNA3-Plasmid-Lösung (1,2 μ g/ μ l)
1 μ l	Restriktionsenzym <i>EcoRI</i> (10 U/ μ l)
1 μ l	Restriktionsenzym <i>KpnI</i> (10 U/ μ l)

Die Ansätze wurden für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert.

Der linearisierte pcDNA3-Vektor wurde anschließend wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben dephosphoryliert. Die geschnittenen Glucokinase- und GLUT2-PCR-Fragmente wurden mit dem *PCR Purification Kit* (Qiagen) über eine Silica Säule aufgereinigt und in 50 µl TE-Puffer eluiert.

2.2.4 Dephosphorylierung der kohäsiven Enden des pcDNA3-Expressionsvektors

Die Dephosphorylierung verhindert eine Religation des Vektors und erhöht die Effizienz der Subklonierung. Durch die Inkubation mit alkalischer Phosphatase (*CIAP*) wurden die Phosphatreste an den 5'- und 3'-Enden der Plasmid-DNA abgespalten.

Die Dephosphorylierung wurde in 60 µl Volumen bei 37 °C für 10 min durchgeführt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit dem *PCR Purification Kit* (Qiagen) über eine Silica-Säule aufgereinigt, da die alkalische Phosphatase die Ligationsreaktion hemmt. Das Eluat wurde auf eine Endkonzentration von 200 ng/µl mit TE-Puffer eingestellt.

45 µl	Restriktionsansatz aus Abschnitt 2.2.3
6 µl	10x Reaktionspuffer
5 µl	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (10 U)
4 µl	steriles bidest. Wasser

10x Reaktionspuffer: 10 mM ZnCl₂, 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3).

2.2.5 Ligation der Glucokinase- und GLUT2-cDNA-Fragmente in den pcDNA3-Expressionsvektor

Die komplementären kohäsiven Enden der Glucokinase-cDNA und des Plasmids pcDNA3, die nach dem Restriktionsverdau entstanden sind, wurden in folgendem Reaktionsansatz ligiert:

4 µl	pcDNA3-Plasmid-Lösung aus Abschnitt 2.2.4 (ca. 400 ng)
4 µl	Glucokinase-cDNA-Lösung aus Abschnitt 2.2.3 (ca. 600 ng)
4 µl	5x T4-DNA-Ligase-Puffer
7 µl	steriles bidest. Wasser <i>ad</i> 20 µl
1 µl	T4-DNA-Ligase (1 Weiss U/µl)

5x T4-DNA-Ligase-Puffer: 250 mM Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % (w/v) Polyethylenglycol 8000

Der Ansatz wurde 18 h bei 16 °C im programmierbaren Thermoblock inkubiert.

2.2.6 Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli*-JM109-Bakterien durch Elektroporation

Die effiziente Transformation von *E. coli*-Bakterien mit Nukleinsäuren erfordert eine Desintegration der Bakterienmembran. Diese kann neben chemischen Verfahren mit divalenten Kationen auch durch ein starkes elektrisches Feld erreicht werden. Hierzu sind Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase besonders geeignet, die durch sequentielle Waschschriffe in ein Medium mit geringem elektrischen Leitwert überführt werden. Durch das Anlegen eines starken elektrischen Feldes (5 kV/cm) wird für 4 und 5 ms die Membran desintegriert, ohne daß die Bakterien absterben. Eine Aufnahme von Fremd-DNA wird somit ermöglicht.

2.2.6.1 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Mit 4 ml einer dicht bewachsenen Übernackkultur *E. coli*-JM109-Bakterien wurden 400 ml LB-Medium angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 0,7 (Kontrolle bei 600 nm im Spektralphotometer) für 3-4 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 30 min auf Eis gekühlt und die Bakterien 15 min bei 4 °C und 4.000 g (Beckman Zentrifuge J2-21) pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die Bakterienpellets in 400 ml 10%igem (v/v) Glycerol resuspendiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurden die Pellets in 200 ml 10%igem (v/v) Glycerol aufgenommen. Es folgte ein weiterer Waschschriffe, bestehend aus Zentrifugation und Resuspension in 10 ml 10%igem (v/v) Glycerol. Nach dem letzten Waschschriffe waren die Bakterien der 400-ml-Kultur in 1 ml 10%igem (v/v)

Glycerol konzentriert. Diese Suspension elektrokompetenter Bakterien wurde in 60 μ l Aliquots auf Kryogefäße aufgeteilt und bei -70 °C gelagert.

2.2.6.2 Elektroporation

Die bei -70 °C kryokonservierten Suspensionen elektrokompetenter *E. coli*-JM109-Bakterien wurden langsam aufgetaut. Je 40 μ l der Bakteriensuspensionen wurden in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Biorad, 0,5 cm Elektrodenabstand) überführt und mit 1 μ l des jeweiligen Ligationsansatzes (1/20) durchmischt. Die Küvetten wurden in den vorgekühlten Küvettenhalter des Elektroporators *Gene Pulser* (Biorad, München) eingebracht und für 4,2 und 4,6 ms einer elektrischen Spannung von 2,5 kV bei einer Kapazität von 25 μ F ausgesetzt. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium überführt und für 1 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

SOC-Medium (pH 7,0) (Sambrook *et al.* 1989):

20 g	Bakto-Tryptone
5 g	Bakto-Yeast-Extrakt
0,5 g	NaCl

Die Substanzen wurden in 950 ml bidest. Wasser gelöst und anschließend 10 ml einer 250 mM KCl-Lösung dazu gegeben. Nach dem Einstellen des pH auf 7,0 wurde die Lösung durch 30minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert. Erst kurz vor dem Gebrauch des Mediums wurde es durch MgCl₂ (Endkonzentration 5 mM) und Glucose (Endkonzentration 20 mM) ergänzt.

Nach der einstündigen Inkubation wurden 20, 50 und 100 μ l der Bakteriensuspensionen zur Selektion auf ampicillinhaltigen (50 μ g/ml) Agarplatten mit einem sterilen Glaspatel ausgestrichen. Nach 12stündigem Bebrüten zeigten sich auf den Agarplatten ca. 100 Kolonien, von denen 18 zur Durchführung von Plasmidminipräparationen in 2 ml ampicillinhaltigem LB-Medium überführt wurden.

LB-Medium (pH 7,4):

10 g	Bakto-Tryptone
5 g	Bakto-Yeast-Extrakt
10 g	NaCl

gelöst in einem Liter bidest. Wasser.

Das Medium wurde anschließend durch Autoklavieren (30 min, 121 °C) sterilisiert.

Die Bakterienklone konnten bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator 16 h wachsen.

2.2.7 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid aus den transformierten Bakterien erfolgte durch alkalische SDS-Lyse nach Birnbaum & Doyle (1979). 2 ml der Bakteriensuspension wurden in Eppendorf-Reagiergefäße pipettiert. 0,5 ml Bakteriensuspension wurden mit 90 µl Glycerol versetzt und in Kryogefäßen bei -70 °C als Stock eingefroren. Die Bakterien aus den 1,5 ml Suspensionen wurden durch Zentrifugieren bei 12.000 g und 4 °C in 5 min pelletiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Pellets in jeweils 100 µl eiskalter Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, RNase A, pH 8,0) resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lösung II (0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS) hinzugegeben und die Flüssigkeiten gemischt. Nach einer 5minütigen Inkubation auf Eis wurden die Ansätze mit einer eiskalten 3 M Kaliumacetat-Lösung (Lösung III) neutralisiert. In der 5minütigen Inkubation auf Eis wurden alle Zellbestandteile bis auf das Plasmid, das im Überstand verblieb, gefällt und anschließend bei 12.000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden in frische Eppendorf-Gefäße überführt. Anschließend wurden die Plasmide mit 150 µl Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert und durch Zentrifugation (12.000 g, 4 °C, 10 min) pelletiert. Die Überstände wurden abgesaugt und die Pellets mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Die Plasmide wurden bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Um eine ausreichende Reinheit der Plasmidpräparation für eine DNA-Sequenzanalyse zu erhalten, wurden die Plasmidlösungen über *Qia Prep* Chromatographie-Säulen aufgereinigt.

Die Plasmidkonzentrationen wurden photometrisch wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben bestimmt. Die Ausbeuten bei 2 ml Bakterienkulturvolumen betragen 3–4 µg Plasmid. Das 260/280-nm-Extinktionsratio als Maß für den Reinheitsgrad betrug 1,6-1,8.

2.2.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Absorption der 1:1000 verdünnten Nukleinsäurelösungen (DNA und RNA) wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer 1 ml Quarzküvette gemessen (Photometer: *Lambda Bio*, Perkin Elmer). Die Konzentration wurde mit der Gleichung

$$c = OD_{260} \cdot \frac{k}{d}$$

c: Konzentration (µg/µl)

OD₂₆₀: Optische Dichte bei 260 nm

d: Küvettendicke (cm)

k: Extinktionkoeffizient (µg•cm/µl)

bestimmt.

Der Extinktionskoeffizient für DNA beträgt bei der gewählten Verdünnung von 1:1000 50 (µg•cm/µl), für RNA 40 (µg•cm/µl).

Durch Messung der Absorption bei 280 nm wurde der Gehalt an verunreinigenden Proteinen bestimmt. Die 260/280-nm-Extinktionsratios als Maß für den Reinheitsgrad lagen bei sauberen Nukleinsäure-Extraktionen zwischen 1,6 und 1,8.

2.2.9 Restriktionsschnittanalyse der Vektoren pcDNA3-GK und pcDNA3-GLUT2

Zur Überprüfung der Subklonierung wurden je 1 µg der Plasmide pcDNA3-GK und pcDNA3-GLUT2 mit den gleichen Restriktionsenzymen *EcoRI* und *KpnI*, die auch für die Subklonierung eingesetzt wurden, unter den in Abschnitt 2.2.3 beschriebenen Bedingungen verdaut. Zur Analyse des Restriktionsverdaus fand eine elektrophoretische Auftrennung der Produkte in einem 1%igen Agarose-TBE-Gel statt (Abschnitt 2.2.10). Positiv waren diejenigen Plasmide, die Glucokinase-cDNA bzw GLUT2-cDNA beinhalten und bei denen 1,8-kb- bzw. 2,0-kb-DNA-Fragmente zu detektieren waren.

2.2.10 DNA-Minigelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA-Molekülen wurde die Gelelektrophorese eingesetzt. 250 mg Agarose wurden in 25 ml TBE-Puffer aufgeschmolzen und zur Fluoreszenz-Anfärbung der DNA mit 0,5 µg/ml Agaroselösung Ethidiumbromid versetzt.

TBE-Puffer (pH 8,3) (Sambrook *et al.* 1989):

89 mM	TRIS/HCl
89 mM	Borsäure
2,5 mM	EDTA

Die DNA-Lösungen (0,5–1 µg DNA) wurden mit 0,2 Volumenanteilen Orange-G-Puffer gemischt und in die Geltaschen geladen. Als Längenstandard wurde ein Molekulargewichtsmarker (*1 kb DNA Ladder*) von Gibco aufgetragen.

Orange-GLUT2-Glucosetransporter-Puffer (Sambrook *et al.* 1989):

50 % (w/v)	Sucrose
1 % (w/v)	Natrium-Laurylsarcosine
0,5 % (w/v)	Orange G

Alle Substanzen wurden in 6x TBE-Puffer gelöst. Anschließend wurde der Orange-G-Puffer mit einem Spritzenvorfilter mit 0,2 µm Porengröße steriltfiltriert.

Die DNA-Auftrennung erfolgte bei 80 V in der horizontalen Elektrophoresekammer *Horizon 58* von Gibco. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mit dem UV-Transilluminator (Vetter) bei einer Wellenlänge von 254 nm. Zur Dokumentation und Auswertung wurden die Gele mit dem Polaroid MP 4 Instant Camera System (Kodak) fotografiert.

2.2.11 Sequenzanalyse der Plasmide pcDNA3-GK und pcDNA3-GLUT2

Die in der Restriktionsschnittanalyse positiven Plasmide wurden durch eine abgewandelte Sequenzierungsmethode nach (Sanger *et al.* 1977) unter Verwendung des *Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit* von Amersham überprüft.

Bei dieser Methode wird eine *in vitro* DNA-Synthese durch die T7-DNA-Polymerase (*Sequenase*) nach Initiierung durch einen spezifischen komplementären Sequenzprimer durchgeführt. Während der DNA-Synthese wird ³⁵S-dATP oder ³³P-dATP in den

neusynthetisierten DNA-Strang eingebaut. Die Termination der DNA-Synthese erfolgt durch Zusatz spezifischer Didesoxynukleotide, die einen Abbruch der DNA-Kette bewirken. Die Fragmente werden unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrer Länge in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. Die Sequenzierung wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

Denaturierung: 3 µg Plasmid in 50 µl TE-Puffer wurden mit 5 µl 2 M NaOH mit 2 mM EDTA für 30 min bei 37 °C denaturiert. Nach Neutralisation mit 5 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) wurde die DNA mit 200 µl Ethanol (100%ig) bei -70 °C für 30 min präzipitiert. Die DNA wurde bei 12.000 g und 4 °C für 15 min pelletiert, mit 100 µl 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet.

Primerhybridisierung: Die denaturierte DNA wurde in 7 µl sterilem bidest. Wasser aufgenommen, mit 1 µl Primer-Lösung (0,8 µM) und 2 µl *Sequenase Reaction Buffer* gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

5x Sequenase Reaction Buffer: 200 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl

Bezeichnung	Sequenz	GK-Sequenz
SEQ-T7	TTAATACGACTCACTATAGGG	-
SEQ-GK1	GCTGTGCAGATGCTGGACGAC	451 - 470
SEQ-GK2	AGTGGAGCGTGAAGACCAAA	751 - 771
SEQ-GK3	ATGTGGTGGCAATGGTGAAT	1051 - 1071
SEQ-GK4	TGGGCGAGCTGGTGC GGCTT	1351 - 1371

Tab. 2.4: Sequenzierprimer für die Glucokinase-cDNA

Bezeichnung	Sequenz	GLUT2-Sequenz
SEQ-T7	TTAATACGACTCACTATAGGG	-
SEQ-GLUT2-1	ATCAATGGCACAGACACCCC	301 – 321
SEQ-GLUT2-2	CTGTACTGTGGGCTAATTTC	601 – 621
SEQ-GLUT2-3	CTCCAGGGTTATGACGAAGT	901 – 921
SEQ-GLUT2-4	GCGGGGCGGCGGACCCTGTT	1201 – 1221
SEQ-GLUT2-5	CCTTATCATTCTGGGCGTT	1501 – 1521
SEQ-GLUT2-6	CTAAATTTGCACCTCGATGC	1801 - 1821

Tab. 2.5: Sequenzierprimer für die GLUT2-cDNA

Markierung: 2 µl wurden mit 8 µl sterilem bidest. Wasser verdünnt.

5x Labeling Mix: 7,5 µM dGTP, 7,5 µM dCTP, 7,5 µM dTTP

In einem 15,5 µl Ansatz wurden folgende Substanzen zu den 10 µl hybridisierte DNA hinzugegeben und für 2 bis 5 min bei Raumtemperatur inkubiert:

1 µl	0,1 M DTT
2 µl	verdünnter <i>Labeling Mix</i>
0,5 µl	[35S] dATP oder [33P] dATP
2 µl	verdünnte <i>Sequenase</i> Lösung (1 U/µl)

Termination: In 4 Eppendorf-Reagiergefäßen wurden jeweils 2,5 µl der entsprechenden *Termination Mix* (*ddA*, *ddG*, *ddC*, *ddT Termination Mix*) bei 37 °C vorgewärmt und 3,5 µl des Markierungsansatzes hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Hinzugabe von *Stop Solution* beendet und die Ansätze bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

ddG Termination Mix: 80 µM jedes dNTPs; 8 µM ddGTP; 50 mM NaCl

ddA Termination Mix: 80 µM jedes dNTPs; 8 µM ddATP; 50 mM NaCl

ddT Termination Mix: 80 µM jedes dNTPs; 8 µM ddTTP; 50 mM NaCl

ddC Termination Mix: 80 µM jedes dNTPs; 8 µM ddCTP; 50 mM NaCl

2x Stop Solution: 95 % (v/v) Formamid; 20 mM EDTA; 0,05 % (v/v) Bromphenolblau;
0,05 % (v/v) Xylencyanol

Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese: Die Reaktionsprodukte wurden für 2 min auf 95 °C erhitzt und in einem 8%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gel in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Modell S2, Gibco) bei einer Spannung von 1600-1800 V aufgetrennt.

Denaturierendes 8 % Polyacrylamidgel, 100 ml:

10 ml	10x TBE-Puffer
7,6 g	Acrylamid
0,3 g	Bis-acrylamid
42 g	Harnstoff (7 M)
25 µl	TEMED
1 ml	Ammoniumpersulfat (10 %)

Der Harnstoff wurde durch eine *Soak*-Lösung (10 % (v/v) Essigsäure; 10 % (v/v) Methanol) in 20 min aus dem Gel herausgelöst. Das Gel wurde auf Filterpapier (GB003, Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen und unter Vakuum für 2 h bei 80 °C getrocknet.

Autoradiographie. Das getrocknete Gel wurde in einer Röntgenkassette auf einem Autoradiographiefilm (*Hyperfilm β-max*, Amersham) für 14 h bei Raumtemperatur exponiert.

2.2.12 Maxipräparation der Plasmide pcDNA3-GK und pcDNA3-GLUT2

Von denen in der Sequenzanalyse positiven Plasmiden wurde eine Plasmidmaxipräparation durchgeführt, um eine ausreichende Menge DNA für die folgenden Transfektionen von Gewebekulturzellen zu erhalten. Die Isolierung der Plasmide erfolgte aus Übernachtskulturen der transformierten *E. coli*-Bakterien durch eine alkalische Extraktion nach Birnboim und Doyle (1979), gefolgt von einer Aufreinigung über eine Ionenaustauschersäule von Qiagen.

250 ml LB-Medium wurden mit dem Antibiotikum, das dem Resistenzmarker des Vektors entspricht, versetzt und mit 100 µl des Glycerolstocks der transformierten *E. coli*-Bakterien beimpft.

LB-Medium (pH 7,4):

10 g	Bakto-Tryptone
5 g	Bakto-Yeast-Extrakt
10 g	NaCl

gelöst in einem Liter bidest. Wasser.

Das Medium wurde anschließend durch Autoklavieren (30 min, 121 °C) sterilisiert.

Die Bakterien wurden im Schüttelinkubator bei 37 °C und 220 rpm 12-14 h inkubiert. Die Bakteriensuspensionen wurden für 30 min auf Eis gelagert und die Bakterien bei 4.000 g und 4 °C in 15 min pelletiert. Die Bakterienpellets wurden anschließend in je 10 ml Puffer P1 (100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und durch Zusatz von 10 ml Lösung P2 (200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS) für 5 min lysiert. Durch Zugabe von 10 ml der Lösung P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) wurde die Lösung unter vorsichtiger Durchmischung neutralisiert und eine Fällung hochmolekularer Proteine und chromosomaler DNA durch eine 20minütige Lagerung auf Eis erreicht. Das Präzipitat wurde bei 10.000 g und 4 °C 30 min pelletiert und der klare Überstand auf eine *Qiagen 500* Ionenaustauschersäule appliziert, die zuvor mit 10 ml der Lösung QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % (v/v) Ethanol, 0,15 % (v/v) Triton X-100, pH 7,0) äquilibriert wurde. Nach der Bindung der Plasmide an die Säulenmatrix wurde diese zweimal mit je 30 ml des Puffers QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS 15 % Ethanol, pH 7,0) gewaschen. Die Elution der Plasmide erfolgte mit 15 ml der Lösung QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, 15 % Ethanol, pH 8,5), die zuvor auf 37 °C vorgewärmt worden war. Die Plasmide wurden anschließend mit 10,5 ml Isopropanol und durch Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C 30 min pelletiert. Das DNA-Pellet wurde vorsichtig mit 15 ml 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und anschließend in jeweils 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20 °C.

Der DNA-Gehalt der Lösungen und ihr Reinheitsgrad wurden photometrisch bestimmt (s. Abschnitt 2.2.7). Die Ausbeuten aus 250 ml Lösung lagen je nach Replikationseffizienz des Plasmids zwischen 250 und 700 µg. Die 260/280-nm-Extinktionsratio als Maß für den Reinheitsgrad betrug 1,6-1,8.

2.3 Gewebekultur von RINm5F-Zellen

RINm5F-Zellen wurden als Monolayer-Kultur in 10 mM glucosehaltigem RPMI-1640 Medium, das mit 10 % fötalem Kälberserum supplementiert war, kultiviert. Zur Verhinderung von bakteriellen Kontaminationen wurden zusätzlich Penicillin (10 U/ml) /Streptomycin (10 µg/ml) dem Medium zugesetzt. Das Medium wurde jeweils nach 72 h erneuert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂, 21 % O₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Gewebekulturschrank. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank durchgeführt. Als Kulturgefäße wurden sterile Einwegprodukte (Greiner) verwendet.

Für alle Untersuchungen wurden RINm5F-Zellen mit einer Passagenanzahl von 89 bis 109 und 19 bis 39 verwendet. Die Zellen wurden zur Erhaltung in 250 cm³ Kulturflaschen ausgesät und das Medium wurde jeweils nach 72 h erneuert. Eine Passagierung der Zellen erfolgte wöchentlich.

2.3.1 Zellpassagierung

Die Zellen wurden zur Erhaltung in 250 cm³ Kulturflaschen gehalten. Eine Passagierung der Zellen erfolgte wöchentlich. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS überspült.

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7,4):

8,00 g NaCl
0,20 g KCl
1,44 g Na₂HPO₄ · H₂O
gelöst in 1000 ml bidest. Wasser.

Das Medium wurde anschließend durch Autoklavieren (30 min, 121 °C) sterilisiert.

Der Zellrasen wurde danach mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,025 %/0,1 %) überschichtet und für 3 min bei 37 °C inkubiert.

EDTA-Stammlösung, 2 % (w/v) (pH 7,4):

4,00 g Na₂EDTA
mit sterilem PBS ad 200 ml.

Die Lösung wurde anschließend durch Autoklavieren (30 min, 121 °C) sterilisiert.

Trypsin-EDTA-Lösung:

10 ml	0,25 % (w/v) Trypsin-Stammlösung
5 ml	2 % (w/v) EDTA-Stammlösung
85 ml	PBS
10 ml	0,25 % (w/v) Trypsin-Stammlösung

mit sterilem PBS ad 200 ml.

Endkonzentrationen: 0,025 % (w/v) Trypsin; 0,1 % (w/v) EDTA

Das Ablösen der Zellen wurde durch leichtes Klopfen unterstützt. Das Trypsin wurde anschließend mit 5 ml FCS-haltigem RPMI-1640 Medium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt, in dem die Zellen durch 5 min Zentrifugation bei 1.000 g pelletiert wurden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in RPMI-1640 Medium resuspendiert. Die Zellen wurden für die Aussaat wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben gezählt. Für die Erhaltungskultur wurden 10^5 Zellen/250 cm³ Flasche ausgesät. Für die Versuchsreihen in unterschiedlich großen Zellkulturgefäßen wurde die Anzahl der auszusäenden Zellen entsprechend angepaßt.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometer

Die Anzahl der Zellen bzw. deren Konzentration in einer Suspension wurde mit Hilfe eines Hämocytometers (Neubauer-Zählkammer) bestimmt. Dabei werden die Zellen unter dem Mikroskop in einem definierten Volumen gezählt. Auf der Neubauer-Zählkammer sind 16 Quadrate. Jedes Quadrat hat eine Fläche von 1 mm²; dies ergibt bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µl. Die Multiplikation des Mittelwerts mit 10^4 ergibt die Zellkonzentration pro Milliliter. Die Gesamtzellzahl ergibt sich nun aus dem Volumen der Zellsuspension multipliziert mit der Zellzahl pro Milliliter (Lindl & Bauer 1994).

2.3.3 Kryokonservierung und Auftauen von eingefrorenen RINm5F-Zellen

Die Zellen wurden in einer Gewebekulturflasche bis zur Konfluenz kultiviert (ca. $1,5 \cdot 10^6$ Zellen / 250 cm³) und wie in Abschnitt 2.3.1 bei der Passagierung beschrieben gewaschen, abgelöst und zentrifugiert. Die Resuspendierung erfolgte im Anschluß

jedoch in vorgekühltem RPMI-1640 Medium, dem 30 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO zugesetzt wurden. Anschließend wurden je 1 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden zunächst zwei Stunden bei -20 °C gelagert, um dann bei -70 °C eingefroren zu werden. Nach 16 Stunden wurden Zellen in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) für die Langzeitlagerung überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im vorgewärmten Wasserbad (37 °C) innerhalb einer Minute aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Schraubdeckelröhrchen überführt und mit 10 ml RPMI-1640 Medium aufgefüllt. Nach anschließender Zentrifugation (5 min bei 1.000 g) wurde der DMSO-haltige Überstand abgesaugt, das Zellpellet durch Zugabe von frischem Medium vorsichtig resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Bei transfizierten Zelllinien wurde als Antibiotikum dem Medium G418 zugesetzt.

2.4 Stabile Transfektion von RINm5F-Zellen

Für die stabile Transfektion von RINm5F-Gewebekulturzellen mit den eukaryontischen Expressionsvektoren pcDNA3-GK und pcDNA3-GLUT2 war es erforderlich, diese Plasmide zunächst zu linearisieren, um eine Integration in das Zellgenom zu ermöglichen. Nach dem liposomalen Gentransfer wurden durch Zugabe von G418 zum Kulturmedium stabile Zellklone selektioniert. Einige Zellklone wurden vermehrt und in Dauerkultur genommen, um die Genexpression von Glucokinase bzw. GLUT2-Glucosetransporter durch *Northern-Blot*- und *Western-Blot*-Analysen nachzuweisen.

2.4.1 Linearisierung der Expressionsvektoren

Die in der Maxipräparation isolierten Plasmide pcDNA3-GK und pcDNA3-GLUT2 (Abschnitt 2.2.12) wurden durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym *ScaI* linearisiert. Hierbei wurde ein Enzym gewählt, das die Plasmid-DNA innerhalb des Ampicillinresistenzgens schneidet. Die Ampicillinresistenz wird bei der Genexpression in Eukaryontenzellen nicht benötigt, sondern dient der Selektionierung von transformierten Bakterien.

	steriles bidest. Wasser <i>ad</i> 50 μ l
5 μ l	10x Puffer B
20 μ g	Plasmid
2 μ l	Restriktionsenzym <i>SacI</i> (10 U/ μ l)

10x Puffer B: 110 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7,9

Die Reaktion wurde bei 37 °C für 2 h im Thermoblock durchgeführt.

Der linearisierte Vektor wurde mit *QIAquick PCR Purification* Säulen aufgereinigt und in 20 μ l sterilem bidest. Wasser eluiert.

2.4.2 Liposomale Transfektion

Für den Transfer der Expressionsvektoren pcDNA3, pcDNA3-GK und pcDNA3-GLUT2 in RINm5F-Zellen wurde Lipofectamine (Gibco) eingesetzt. Lipofectamine ist ein Gemisch aus einem polykationischen und einem neutralen Lipid, das nach Ultraschallbehandlung in wässriger Lösung positiv geladene Liposomen bildet. Die negativ geladene DNA wird sehr effektiv durch die Liposomen gebunden. Die Liposomen-Nukleinsäure-Komplexe adsorbieren an den Zelloberflächen, fusionieren mit der Zellmembran und transferieren so die DNA in die Zelle. Im Gegensatz zu anderen Transfektionsverfahren wie Calciumphosphatpräzipitation, Polykationen oder Elektroporation ist Lipofectamine 5- bis 100fach effektiver bei verminderter Zelltoxizität.

Für die Transfektion wurden 10⁶ Zellen auf einer 6-cm-Zellkulturschale für 24 h kultiviert. Für die Lösung A wurden 2 μ g Vektor-DNA in 100 μ l serumfreien RPMI-1640 Medium gelöst. Lösung B bestand aus 12 μ l *ad* 100 μ l serumfreien RPMI-1640 Medium. Beide Lösungen wurden durch vortexen miteinander gemischt und für 30 min bei RT inkubiert, damit sich die Liposomen-Nukleinsäure-Komplexe ausbilden konnten. Die 200 μ l Lösung wurden gleichmäßig auf den Zellrasen pipettiert und mit serumfreiem Medium auf 1,2 ml aufgefüllt. Nach einer 6stündigen Kultivierung der Zellen unter Standardzellkulturbedingungen wurde das Lipofectamin-haltige Medium abgesaugt und die Zellen mit FCS-haltigem RPMI-1640 Medium kultiviert.

Die Transfektion des pcDNA3-Vektors ohne cDNA-Insert (*Mock*-Transfektion) diente dazu, den Einfluß der Transfektion und der Expression des Neomycinresistenzgens auf die Zelle zu überprüfen.

Als Negativkontrolle der Transfektion wurden Zellen nur mit Lipofectamine-haltigem Medium (ohne DNA) wie oben beschrieben eingesetzt.

Vor der Transfektion wurden die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend mit 1,2 ml serumfreiem Medium überschichtet.

2.4.3 Selektion G418-resistenter RINm5F-Zellklone

48 h nach der Transfektion wurde dem RPMI-1640 Zellkulturmedium G418 (250 µg/ml) zur Selektion von transfizierten Zellklonen zugesetzt.

G418-Stammlösung:

500 mg G418
mit sterilem PBS Puffer *ad* 20 ml
Lagerung bei 4 °C

Die Lösung wurde mit einem Spritzenvorfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert.

Während des Selektionszeitraums von 2 bis 6 Wochen wurde das G418-haltige Medium alle drei Tage gewechselt. Als Negativkontrolle der Selektion wurden Zellen nur mit Lipofectamine-haltigem Medium (ohne DNA) beschrieben inkubiert. Nur wenn diese Zellen durch den Antibiotikumzusatz abgestorben waren, wurden die sich ausbildenden Zellkolonien bei den Vektor-transfizierten Zellen auf 24-*well*-Zellkulturgefäßen einzelt und für weitere Untersuchungen verwendet. Danach wurden die Zellklone weiterhin mit Antibiotikumzusatz kultiviert, um stabile Genexpression von Glucokinase bzw. GLUT2-Glucosetransporter zu gewährleisten.

2.5 Northern-Blot-Analyse

Die *Northern-Blot*-Analyse als Methode zur Überprüfung der Expression eines Gens auf mRNA-Ebene umfaßt die Auftrennung der RNA-Proben in einem denaturierenden Agarosegel, den Transfer auf eine Nylonmembran sowie die Hybridisierung mit spezifischen Gensonden.

2.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte nach der sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski & Sacchi 1987). Für die RNA-Isolierung aus RINm5F-Zellen wurden die konfluent auf einer 9-cm-Kulturschale gewachsenen Zellen (ca. $1,5 \cdot 10^7$) mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 3 ml GTC-Lösung lysiert und das Lysat in ein steriles 13 ml Polypropylen Zentrifugenröhrchen überführt.

GTC-Lösung:

4 M	Guanidiniumthiocyanat
25 mM	Natriumcitrat-Lösung (pH 7,0)
0,1 M	β -Mercaptoethanol
0,5 % (v/v)	Natrium-Laurylsarcosin

gelöst in einem Liter bidest. Wasser.

Die Lösung wurde durch Spitzenvorfilter (Schleicher & Schuell, Porengröße 0,2 μ m) filtriert und bei RT gelagert.

Das Homogenat wurde nach Ansäuern mit 0,1 Vol. 2 M Natriumacetat (pH 4) mit 1 Vol. wassergesättigtem Phenol und 0,2 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (v/v; 49:1) gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert.

Wassergesättigtes Phenol:

Phenol wurde im Originalgefäß bei 60 °C im Wasserbad geschmolzen. Steriles bidest. Wasser wurde bis zur Sättigung der Phenolphase zugegeben. Das wassergesättigte Phenol wurde bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Die Suspension wurde anschließend für 20 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert, die RNA in der wäßrigen Phase in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1 Vol. Isopropanol für 24 h bei -20 °C präzipitiert. Die präzipitierte RNA wurde durch Zentrifugation (Beckman Zentrifuge J2-21, Rotor JA-20) bei 10.000 g (4 °C) für 20 min pellettiert. Für einen weiteren Präzipitationsschritt wurde das RNA-Pellet in 0,5 Vol. GTC-Lösung gelöst und mit einem gleichem Volumenanteil Isopropanol versetzt. Das nach dreistündiger Präzipitation bei -20 °C und anschließender Zentrifugation gewonnene RNA-Pellet wurde zweimal mit 250 μ l Ethanol überspült und nach 10minütigem Lufttrocknen in sterilem bidest. Wasser gelöst. Zur spektrometrischen Konzentrations-

bestimmung (s. Abschnitt 2.2.8) wurde ein Aliquot 1:1000 mit sterilem bidest. Wasser verdünnt, während der Rest bis zum Gebrauch bei -70 °C gelagert wurde.

2.5.2 Gelelektrophorese zur Auftrennung der RNA

Zur Auftrennung der Gesamt-RNA wurden denaturierende 1%ige (w/v) MOPS-Agarosegele unter Zusatz von 5 % Formaldehyd hergestellt.

MOPS Puffer (pH 7,0):

20 mM	MOPS
5 mM	Natriumacetat
1 mM	EDTA

Die Auftrennung der RNA erfolgte mit MOPS-Laufpuffer in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Horizon 11-4, Gibco) bei einer konstanten Spannung von 100 V. Die elektrophoretische Trennung wurde beendet, als die Bromphenolblau-Lauffront das Gelende erreicht hatte (ca. 3 h). Für die Analyse der Genexpression wurden 10 µg RNA pro Bahn geladen. Die jeweiligen RNA Mengen wurden vor dem Auftragen mit 1 Vol. *Loading* Puffer vermischt und 15 min bei 65 °C denaturiert.

Loading Puffer:

52 % (v/v)	deionisiertes Formamid
17 % (v/v)	37%iges Formaldehyd
10 % (v/v)	10x MOPS-Puffer pH 7,0
7 % (v/v)	steriles bidest. Wasser
7 % (v/v)	Glycerol
6 % (v/v)	10%ige wäßrige Bromphenolblau-Lösung
1 % (v/v)	Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml)

Die Detektion der 18-S- und 28-S-Banden erfolgte unter UV-Illumination auf einem Transilluminator (Vetter) bei einer Wellenlänge von 254 nm. Von den Agarosegelen wurde zur Dokumentation und späteren Auswertung eine *Polaroid*-Fotographie (*Polaroid MP 4+Instant* Kamera System) angefertigt.

2.5.3 Herstellung DIG markierter *Antisense*-RNA-Sequenzen

Die Markierung der *Antisense*-RNA Gensonden erfolgte durch 11-DIG-UTP nach Melton et al. (1984). Dabei wird in einer *in vitro* Transkription von einer an Phagenpromotoren initiierten RNA-Polymerase digoxigeninmarkiertes Uridintriphosphat (DIG-UTP) in die neu synthetisierte *Antisense*-RNA eingebaut. Vier bis fünf Prozent aller eingebauten Nukleotide des RNA-Stranges bestehen aus DIG-UTP. Die Detektion der markierten Sonden erfolgte durch ein nicht-radioaktives DIG-Lumineszenz-Nukleinsäure-Detektions-System von Boehringer Mannheim. Dabei wird ein gegen das Hapten-Digoxigenin gerichteter Antikörper (Anti-DIG-Antikörper) verwendet, der gleichzeitig mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Bei der Dephosphorylierung des Chemilumineszenzsubstrates Lumigen CSPD durch die alkalische Phosphatase in einem alkalischen Milieu wird instabiler Singulett-Sauerstoff gebildet. Während des Zerfalls entsteht Licht, das durch Röntgenfilmexposition detektiert werden kann.

Die Markierung der *Antisense*-RNA mit Hilfe des DIG-Detektions-Systems zeigt gegenüber anderen Systemen folgende Vorteile:

Gegenüber der radioaktiven Markierung hat die DIG-Markierung den Vorteil der längeren Lagerung einmal markierter Nukleotidstränge ohne den Verlust der Detektierbarkeit. Die Sensitivitätsgrenze dieser Markierungsmethode liegt bei 0,03 pg homologer DNA und 0,5 pg homologer RNA. Sie liegt damit im gleichen Sensitivitätsbereich wie radioaktive Verfahren, vermeidet jedoch den Einsatz radioaktiver Nuklide.

Für die Synthese von spezifischen Digoxigenin (DIG) markierten cRNA-Gensonden wurden die Plasmide pcDNA3-GK und pcDNA3-GLUT2 als Matrizen für die SP6-RNA-Polymerase eingesetzt. Die Vektoren besitzen am 3'-Ende der *Multiple cloning sites* die Promotorsequenz für die SP6-RNA-Polymerase, so daß die *in vitro* RNA-Synthese von GK-cRNA bzw. GLUT2-cRNA ermöglicht wurde.

2.5.3.1 Plasmid-Linearisierung

Für die Herstellung von spezifischen cRNA-Gensonden für die *Northern-Blot*-Hybridisierung müssen die Plasmide durch geeignete Restriktionsenzyme linearisiert werden. Als Schnittstellen wurden Sequenzen in der *Multiple cloning site* der Plasmide gewählt,

so daß ein Transkriptionsabbruch am 3'-terminalen Ende der cRNA gewährleistet war, um eine Transkription nicht-codierender Plasmidsequenzen zu vermeiden.

steriles bidest. Wasser *ad* 50 µl
5 µl 10x Puffer *EcoRI*
20 µg Plasmid
2 µl Restriktionsenzym *EcoRI* (10 U/µl)
Inkubation bei 37 °C für 2 h

10x Puffer *EcoRI*: 110 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7,9

Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 95 °C (5 min) abgestoppt und das Reaktionsgemisch auf Eis gelagert. Die Effizienz des Restriktionsverdau wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem 1%igen (w/v) TBE Agarosegel (Abschnitt 2.2.10) kontrolliert.

2.5.3.2 *In vitro* RNA-Transkription

Folgende Substanzen wurden in ein steriles Eppendorf-Reagiergefäß pipettiert. Die Transkription wurde durch Zusatz von SP6-RNA-Polymerase initiiert.

steriles bidest. Wasser *ad* 20 µl
2 µl 10x Transkriptions-Puffer
je 2 µl ATP, CTP, GTP (jeweils 10 mM)
2 µl UTP (6,5 mmol/l)-DIG-UTP (3,5 mM)-Lösung
0,5 µl Ribonuclease-Inhibitor RNasin (20 U/µl)
1 µg linearisiertes Plasmid pcDNA3-GK oder pcDNA3-GLUT2
2 µl SP6-RNA-Polymerase (20 U/µl)
Inkubation bei 37 °C für 2 h

10x Transkriptonspuffer: 110 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7,9

Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl DNase I (RNase frei, 10 U/µl) wurde die Plasmid-DNA verdaut (15 min bei 37 °C). Die RNA wurde durch Ethanolfällung aufgereinigt.

Ethanolfällung

0,1 Vol.	steriles bidest. Wasser	ad 20 µl
2,5 Vol.	Ethanol	
4 µl	Hefe t-RNA	

Nach gründlicher Durchmischung wurde die cRNA in 16 h bei -20 °C gefällt und durch Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C in 30 min pelletiert. Die Hefe t-RNA diente dabei als Fällungshilfe. Das Pellet wurde vorsichtig mit 200 µl Ethanol gewaschen und bei RT luftgetrocknet. Die in 20 µl sterilem bidest. Wasser aufgenommenen Gensonden wurden durch Auftrennung eines 1 µl Aliquots in einem 1%igen (w/v) MOPS-Agarosegel analysiert. Die Vollständigkeit der Synthese konnte mit Hilfe eines mitlaufenden RNA-Längenstands (Gibco) überprüft werden.

2.5.4 Northern-Blot-Transfer

Zum Transfer der im Agarosegel aufgetrennten Gesamt-RNA auf eine Nylonmembran wurde das Vakuumblottingssystem *VacuGene XL* von Pharmacia verwendet. Die amphotere *Hybond N* Membran (Amersham) wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und in die Blottingapparatur eingelegt. Das Agarosegel wurde luftblasenfrei aufgelegt. Durch Anschluß an eine Vakuumpumpe wurde ein Unterdruck von ca. 40 bis 50 mbar erzeugt. Das Agarosegel wurde während des einstündigen gesamten *blottings* mit 20x SSC-Puffer überschichtet.

20x SSC Puffer (pH 7,0):

3 M	NaCl
0,3 M	Natriumcitrat

Der Puffer wurde anschließend durch Autoklavieren (30 min, 121 °C) sterilisiert.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran mit 2x SSC gewaschen, um Agarosereste zu entfernen. Die auf der Membran adsorbierte RNA wurde durch

Bestrahlen mit UV Licht (30 s) der Wellenlänge 254 nm auf der Membranoberfläche fixiert. Dabei gehen die RNA-Moleküle eine kovalente chemische Bindung mit der Nylonmembran ein.

2.5.5 Northern-Blot-Hybridisierung

Bei der Hybridisierung wurden mit Hilfe der DIG-markierten *Antisense*-RNA-Gen-sonden die spezifischen mRNAs der Glucokinase und der GLUT2-Glucosetransporters quantitativ nachgewiesen.

2.5.5.1 Prähybridisierung

Die Membran wurde in einem Folienschlauch nach Zugabe von vorgewärmter Prähybridisierungslösung luftblasenfrei mit einem Haushaltsfolien-Schweißgerät eingeschweißt. Die Prähybridisierung erfolgte bei 68 °C im Schüttelwasserbad (GFL Wasserbad 1083) für 2 h.

20x SSPE-Lösung (pH 7,4):

0,2 M	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O
4 M	NaCl
0,02 M	EDTA

Der Puffer wurde anschließend durch Autoklavieren (30 min, 121 °C) sterilisiert.

100x Denhardt-Lösung:

2 % (w/v)	Ficoll 400
2 % (w/v)	PVP
2 % (w/v)	BSA

Alle Substanzen wurden in sterilem bidest. Wasser gelöst und mit einem Spritzenvorfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert.

Prähybridisierungslösung:

25 % (v/v)	20x SSPE-Lösung
50 % (v/v)	deionisiertes Formamid
10 % (v/v)	100x Dehnhardt-Lösung
5 % (v/v)	20%ige Natrium-Laurylsarcosin-Lösung
10 % (v/v)	steriles bidest. Wasser
250 µl	Herings-DNA (10 µg/µl), die zuvor 10 min bei 95 °C denaturiert wurde

Deionisiertes Formamid:

500 ml Formamid wurden über Nacht mit 50 g Mischbettionenaustauscher (Serdolit MB 2, Serva) deionisiert, bis ein pH < 4 erreicht wurde.

2.5.5.2 Hybridisierung

Nach der Prähybridisierung wurde zu der Prähybridisierungslösung die Gensonde in einer Endkonzentration von 150 ng/ml hinzupipettiert. Die Hybridisierungsdauer betrug 12 h bei 68 °C.

2.5.5.3 Waschschritte

Durch die an die Hybridisierung angeschlossenen Waschschritte wurde überschüssige Gensonde bzw. unspezifisch gebundene Gensonde heruntergewaschen. Für eine fehlerfreie Detektion und zum Ausschluß von unspezifischen Fehlhybridisierungen war ein stringenter Waschvorgang unbedingt erforderlich. Die von der Hybridisierungslösung abgetropfte Membran wurde zweimal 15 min in Waschpuffer 1 und anschließend 30 min in Waschpuffer 2 gewaschen.

Waschpuffer 1:

10 % (v/v)	20x SSPE-Lösung
0,5 % (v/v)	20%ige Natrium-Laurylsarcosin-Lösung

Waschpuffer 2:

- 0,5 % (v/v) 20x SSPE-Lösung
- 0,5 % (v/v) 20%ige Natrium-Laurylsarcosin-Lösung

Die Membranen befanden sich bei den Waschschritten mit der Oberfläche nach unten zeigend in Plastikgefäßen, die im temperierten Schüttelwasserbad standen. Die Temperatur betrug 68 °C.

2.5.5.4 Detektion

DIG-markierte RNA-Hybride wurden in einem spezifischen Immunoassay unter Verwendung eines an alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-DIG-Antikörpers detektiert und durch das Chemilumineszenzsubstrat CSPD auf einem Autoradiographiefilm sichtbar gemacht. Alle folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Nach dem Waschen erfolgte eine Äquilibrierung der Membran in Puffer 3, bevor sie für 30 min zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in Puffer 2 inkubiert wurde.

Puffer 1 (pH 7,5):

- 100 mM Maleinsäure
- 150 mM NaCl

Puffer 2:

- 10 % (v/v) Blocking-Reagenz
- in Puffer 1 gelöst

Puffer 3:

- 0,3 % (v/v) Tween 20
- in Puffer 1 gelöst

Der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Anti-DIG-Antikörper wurde in einer Konzentration von 0,075 U/ml mit Puffer 2 verdünnt. Die blockierte Membran wurde für 30 min in der Antikörperlösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 20 min in Puffer 3 gewaschen und danach kurz mit Puffer 4 äquilibriert und für 5 min mit 1 ml 1:100 in Puffer 4 verdünnter CSPD-Lösung im Dunkeln inkubiert.

Puffer 4 (pH 7,4):

100 mM	Tris/HCl
100 mM	NaCl
50 mM	MgCl ₂

in sterilem bidest. Wasser gelöst

Die feuchte Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschweißt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran in einer Filmkassette (Cronex 18x24) einem Autoradiografiefilm (*Hyperfilm MP*, Amersham) für 20 bis 180 min exponiert. Die Expositionszeiten wurden dabei so gewählt, daß keine Überexpositionen auftraten. Die Filme wurden mit den Standardentwicklern (LX 24, Kodak) und Fixierer (AL 4, Kodak) entwickelt.

2.6 Western-Blot-Analyse

2.6.1 Herstellung von Zellextrakten

Für die *Western-Blot*-Analysen wurden 15 Mio. RINm5F-Zellen abtrypsinisiert, mit Homogenisationspuffer gewaschen und in 250 µl Homogenisationspuffer aufgenommen. Durch dreimalige Ultraschallbehandlung von jeweils 20 s bei 0 °C wurden die Zellen lysiert.

Parallel wurden 1 g Rattenleber in 3 ml Homogenisationsmedium in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator mit Teflonpistill (Kontes) homogenisiert und ebenfalls dreimal für 20 s mit Ultraschall behandelt.

Die Homogenate wurden für 10 min bei 4 °C und 1.000 g zentrifugiert, um grobe Zellbestandteile abzutrennen (Zentrifuge: Eppendorf 5402). Der Proteingehalt der Überstände wurde mittels BCA-Assay bestimmt.

Homogenisationsmedium (pH 7,4):

70 mM	Sucrose
210 mM	D-Mannit
1 mM	EGTA
20 mM	HEPES

2.6.2 Isolierung von mikrosomalen Membranfraktionen

Für die *Western-Blot*-Analyse des in der Zellmembran lokalisierten GLUT2-Proteins war die Isolierung von Mikrosomenfraktionen aus RINm5F-Zellen und Rattenleber-Homogenaten notwendig. 10-20 Mio. RINm5F-Zellen wurden nach dem Abtrypsinieren in 3,5 ml Puffer A aufgenommen.

Puffer A (pH 7,4):

20 mM	KH ₂ PO ₄
80 mM	Na ₂ HPO ₄
0,1 M	KCl
1 mM	PMSF
0,1 mM	DTT
1 mM	EDTA

1 g Rattenleber wurde in 3,5 ml Puffer A mit Hilfe des Ultraturrax (IKA T25) homogenisiert. Sowohl die Leber- als auch die RINm5F-Zellen wurden durch zweimal 1 min Ultraschallbehandlung bei 0 °C lysiert. Durch eine Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C für 20 min wurden grobe Zellbestandteile pelletiert. Die Überstände wurden einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 100.000 g bei 4 °C für 1 h (Ultrazentrifuge: Kontron) unterzogen. Anschließend wurden die pelletierten Membranfraktionen in 3,5 ml Puffer B durch Ultraschallbehandlung resuspendiert und erneut bei 100.000 g und 4 °C für 1 h zentrifugiert.

Puffer B (pH 7,4):

20 mM	KH ₂ PO ₄
80 mM	Na ₂ HPO ₄
1 mM	PMSF
0,1 mM	DTT
1 mM	EDTA

Die Pellets wurden in 50-100 µl Puffer C aufgenommen.

Puffer C (pH 7,4):

20 mM	KH ₂ PO ₄
80 mM	Na ₂ HPO ₄
1 mM	EDTA
20 % (v/v)	Glycerol

Der Proteingehalt der mikrosomalen Membranfraktionen wurde mit dem BCA-Assay bestimmt.

2.6.3 Bestimmung des Proteingehaltes mittels BCA-Assay

Beim BCA-Assay werden Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung durch Protein quantitativ zu Cu⁺-Ionen reduziert (Biuret Reaktion). Die Konzentration der entstehenden Cu⁺-Ionen kann nach Komplexierung mit Bichincholindicarbonsäure photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt werden. Als Standards wurden BSA-Lösungen mit folgenden Konzentrationen verwendet:

0, 100, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg BSA/ml in 0,9%iger NaCl-Lösung.

20 µl der jeweiligen BSA-Lösung wurden mit 200 µl des BCA-Färbereagens versetzt.

BCA-Färbereagenz:

50 Vol.	BCA-Fertigreagenz (Pierce)
1 Vol.	4%ige (w/w) CuSO ₄ -Lösung

Von Zellextrakten und Membranfraktionen wurden 1–5 µl zu 200 µl BCA-Farbreagenz, die in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte vorgelegt waren, pipettiert. Nach

30minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion von Standard- und Probelösungen in Dreifachbestimmung im Mikrotiterplatten-Photometer (Anthos ht III) bei 562 nm gemessen. Aus den Meßwerten der Standard-Lösungen konnte nach linearer Regression eine Funktion berechnet werden, mit der die Proteinkonzentrationen der Probelösungen ermittelt wurden.

2.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine aus Leber und RINm5F-Zellen wurden in SDS-Polyacrylamidgelen in einer Minigel-Vertikalelektrophorese-Kammer (10 x 10 cm Minigel Twin, Biometra) unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (Laemmli 1970). Die Polymerisation des 10 % (w/v) Acrylamid-Trenngels und des 5 % (w/v) Acrylamid-Sammelgels wurden mit 0,1 % (v/v) TEMED und 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat gestartet. Das Trenngel wurde bis zur Polymerisation mit Butanol überschichtet.

10%iges (w/w) Acrylamid Trenngel:

33,3 % (v/v)	Acrylamid (30 % (w/v))/Bisacrylamid (0,8 % (w/v))-Lösung
25 % (v/v)	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
1 % (v/v)	10%ige (w/v) SDS-Lösung
40,7 %	bidest. Wasser

5%iges (w/v) Acrylamid Sammelgel:

16,5 % (v/v)	Acrylamid (30 % (w/v))/Bisacrylamid (0,8 % (w/v))-Lösung
12,5 % (v/v)	1,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
1 % (v/v)	10%ige (w/v) SDS-Lösung
70 %	bidest. Wasser

Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit dem Probenpuffer gemischt und anschließend für 3 min bei 95 °C denaturiert.

5x Probenpuffer (pH 6,8):

62,5 mM	Tris/HCl
0,25 % (w/v)	SDS
45 % (w/v)	Glycerol
500 mM	DTT
0,0025 % (w/v)	Bromphenolblau

Als Elektrodenpuffer wurde das von Laemmli (1970) beschriebene Tris-Glycin-SDS-Puffersystem verwendet.

Elektrodenpuffer:

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

Die Auftrennung erfolgte zunächst bei 4 V/cm und wurde nach dem Eintritt der Lauffront in das Trenngel auf 12 V/cm erhöht. Als Molekulargewichtsmarker diente die *10 kDa Protein Ladder* von Gibco.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele im *Semidry*-Verfahren auf PVDF-Membranen geblottet.

2.6.5 *Western-Blot-Transfer*

Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel wurde durch *semidry blotting* (*Semidry Blotter*, Biometra) mit einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Westmeier (1990) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P Transfer Millipore) durchgeführt. Der Blotstapel hatte folgenden Aufbau:

- Anode
- 4 Blotpapiere (GB003, Schleicher und Schuell, Dassel), getränkt mit Anodenpuffer 1
- 2 Blotpapiere, getränkt mit Anodenpuffer 2
- PVDF-Membran. Die Membran wurde zuvor 1-2 min in Methanol gelagert, anschließend in bidest. Wasser gewaschen und in Anodenpuffer 2 äquilibriert.

- Polyacrylamidgel
- 4 Blotpapiere, getränkt mit Kathodenpuffer
- Kathode

Anodenpuffer I:

300 mM	Tris
0,01 % (w/v)	Natriumazid
20 % (v/v)	Methanol

Anodenpuffer II:

25 mM	Tris
0,01 % (w/v)	Natriumazid
20 % (v/v)	Methanol

Kathodenpuffer:

40 mM	6-Aminohexansäure
20 % (v/v)	Methanol
0,01 % (w/v)	SDS
0,01 % (w/v)	Natriumazid

Der Transfer erfolgte bei 140 mA und 30 V für 1 h. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit Ponceau-Lösung 0,2 % für 3 min gefärbt, um die Effizienz des Transfers festzustellen. Gleichzeitig wurden die Positionen der Molekulargewichtsmarker auf der Membran markiert. Die Membran wurde danach mit PBS entfärbt und in die *Western-Blot*-Hybridisierung eingesetzt.

2.6.6 *Western-Blot*-Hybridisierung

Die PVDF-Membran wurde für 1 h bei RT oder 16 h bei 4 °C mit 20 ml Blockierungs-Lösung abgesättigt.

Blockierungs-Lösung:

5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST-Puffer

TBST-Puffer (pH 8):

150 mM NaCl
10 mM Tris
0,05 % (v/v) Tween 20

Danach wurde die Membran dreimal für 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion der auf der PVDF-Membran gebundenen Glucokinase -oder GLUT2-Proteine durch einen spezifischen Anti-Rattenleber-Glucokinase-Antikörper (1:16000 in TBST-Puffer) bzw. einen spezifischen Anti-Rattenleber-GLUT2-Antikörper (1:10000 in TBST-Puffer) für 4 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde danach dreimal für 10 min in TBST-Puffer gewaschen und mit einem peroxidase markierten Anti-Kaninchen-IgG-Sekundärantikörper (1:10000 in TBST-Puffer) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Chemilumineszenzdetektion wurde mit den Reagentien des *ECL* Systems von Amersham durchgeführt und die Proteinbanden auf einem Autoradiographiefilm (*Hyperfilm MP*, Amersham) dokumentiert. Die Expositionszeiten der Filme lagen zwischen 5 s und 1 min.

2.7 Messung der Glucokinase-Enzymaktivitäten von Zellhomogenaten

Die Glucokinase-Enzymaktivitäten wurden in einem enzymgekoppelten photometrischen Test gemessen (Lenzen *et al.* 1987b). Das bei der Phosphorylierung des Substrats D-Glucose durch die Glucokinase gebildete Glucose-6-phosphat wird durch Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton umgesetzt. Das durch die Dehydrogenierung entstehende Molekül NADPH wird photometrisch bei 340 nm gemessen.

800 µl Reaktionsmedium (37 °C) wurde in einer Quarzküvette mit 5 µl RINm5F-Zellhomogenaten oder Leberhomogenaten versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von

40 µl 21x konzentrierter Glucoselösung gestartet. Folgende Glucosekonzentrationen wurden für den Test eingesetzt:

0; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50 mM

Reaktionsmedium:

20 mM	HEPES
125 mM	KCl
7,5 mM	MgCl ₂
5 mM	Na-ATP
0,5 mM	NADP
200 mU	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
2 mU	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase

Die Extinktionsänderungen bei 340 nm wurden über 10 min in 10 s Abständen mit dem Photometer Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer Lambda Bio 12 gemessen.

Die gemessenen Extinktionsänderungen wurden nach folgender Formel in die spezifische Enzymaktivität umgerechnet:

$$V = \frac{\Delta E \cdot V_p}{\epsilon_0 \cdot d \cdot c_p}$$

V : Enzymaktivität (U)

ΔE : Extinktionsänderung (mOD/min)

V_p : Volumen des Reaktionsansatzes (845 µl)

ε₀ : molarer Extinktionskoeffizient (6,23 · 10⁶ cm²/mol für NADPH)

d : Küvettendicke (1 cm)

Eine *Unit* Glucokinase-Enzymaktivität ist definiert als 1 µmol Glucose-6-phosphat, gebildet aus Glucose und ATP in einer Minute bei 37° C. Die berechneten *Units* wurden auf µg DNA bezogen, um die Anzahl der Zellen in den Homogenaten zu berücksichtigen.

2.8 Glucoseoxidation in RINm5F-Zellen

RINm5F-Zellen wurden auf 9-cm-Gewebekulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz unter Standardgewebekulturbedingungen in RPMI-1640 Medium kultiviert. Nach einer 30minütigen Vorinkubation in glucosefreiem RPMI-1640 Medium wurden die Zellen abtrypsiniert, gezählt und ihre Konzentration auf 150.000 Zellen/20 μ l KR-Puffer eingestellt. In speziellen Reagiergefäßen (Lenzen & Panten 1985) wurden jeweils 20 μ l der folgenden ^{14}C (U)-Glucoselösungen vorgelegt:

Konzentration mM	Spezifische Aktivität mCi/mol Glucose
0,2	10
1	2
2	1
4	0,5
10	0,02
20	0,1

Die Reaktion wurde mit dem Hinzupipettieren von 20 μ l Zellsuspension gestartet. Die Reagiergefäße wurden sofort in Zählröhrchen eingebracht, die gasdicht verschlossen für 1 h bei 37 °C inkubiert wurden. Nach Ablauf der Zeit wurden 50 μ l einer 0,2 M HCl-Lösung zum Abstoppen der Reaktion durch ein Septum des Zählröhrchendeckels mit einer Kanüle in das Reagiergefäß injiziert. Zur Absorbtion des gebildeten Kohlenstoffdioxids wurden 100 μ l PEA durch das Septum auf ein Filterpapier, das sich auf dem Boden des Zählröhrchens befand, injiziert. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zählröhrchen geöffnet, die Reagiergefäße vorsichtig entfernt und 5 ml Flüssigszintillator (HiSafe, Wallac) in das Zählröhrchen pipettiert. Die Menge des gebildeten $^{14}\text{CO}_2$ konnte im β -Szintillationszähler (Wallac Wizard 1400) quantifiziert werden.

2.9 Glucoseaufnahme in RINm5F-Zellen

200.000 RINm5F-Zellen wurden auf 35-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und konnten in 48 h unter Standardgewebekulturbedingungen in RPMI-1640 Medium bis zur

Konfluenz wachsen. Die Zellen wurden mit 2,5 ml PBS gewaschen und anschließend zweimal mit 2,5 ml KR-Puffer für 15 min bei 37 °C inkubiert.

KR-Puffer (Krebs-Ringer-Puffer):

11,5 mM	NaCl
0,47 mM	KCl
0,26 mM	CaCl ₂ 2 H ₂ O
0,12 mM	KH ₂ PO ₄
0,12 mM	MgSO ₄ 7 H ₂ O
10,0 mM	HEPES
20,0 mM	NaHCO ₃
0,1 %	FCS

Die Messung der Glucoseaufnahme erfolgte mit 700 µl KR-Puffer, dem 10 mM 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose (spezifische Aktivität 10 µCi/ml) zugesetzt wurden. Nach 10, 20, 40, 60 und 120 s Inkubationszeit wurde das radioaktive Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 2 ml eiskalter 100 mM nicht-radioaktiver Glucoselösung fünfmal gewaschen. Danach wurden die Zellen in 1 ml 0,1%iger SDS-Lösung lysiert. Die Radioaktivität der Lysate wurde durch Flüssigszintillationszählung (Szintillator: HiSafe, Wallac) im β-Szintillationszähler bestimmt. Die aufgenommene 3-O-Methylglucose-Menge wurde auf DNA-Menge der inkubierten Zellen bezogen. Die halbmaximale 3-O-Methylglucose-Aufnahmezeit und die maximale 3-O-Methylglucose-Aufnahme wurden durch nicht-lineare Regression mit dem Analyseprogramm Prism 2.01 (GraphPad) berechnet.

2.10 Insulinsekretion und Insulingehalt von RINm5F-Zellen

Zur Untersuchung der Insulinsekretion in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration und des Insulingehaltes wurden 500.000 RINm5F-Zellen je Kavität auf 12-well-Gewebekulturplatten ausgesät und für 24 h unter Standardkulturbedingungen in RPMI-1640 Medium kultiviert. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit KR-Puffer, für 30 min in RPMI-1640 Medium ohne Glucose inkubiert. Nach einem weiteren

Waschschritt mit KR-Puffer fand die Inkubation der Zellen für 20 min in 1 ml KR-Puffer mit folgenden Glucosekonzentrationen statt:

0; 50; 100; 250; 500 μ M
1; 2,5 5; 10 mM

Zusätzlich wurden die Zellen mit 25 mM KCl in KR-Puffer inkubiert, um die Insulinsekretion maximal zu stimulieren. Der KR-Puffer wurde anschließend abgesaugt und in Eppendorf-Reagiergefäße überführt. Durch einen nachfolgenden Zentrifugationsschritt bei 1.000 g für 5 min sollte gewährleistet werden, daß sich keine Zellen in der KR-Puffer-Lösung befinden. Bis zur Messung der Insulinkonzentration der Proben wurden sie bei -20 °C gelagert.

Um den Insulingehalt der RINm5F-Zellen zu bestimmen, wurde auf den Zellrasen, nachdem der Inkubationspuffer abgesaugt worden war, 1 ml saures Ethanol (Ethanol /Wasser/HCl = 140:57:3 (v/v)) pipettiert. Nach 16 h Lagerung bei 4 °C konnten die Zellen von den Kulturplatten abgeschabt werden und standen für die Messung des Insulingehalts mittels Radioimmunoassay zur Verfügung.

Die Zellen von je 2 Kavitäten einer 12-*well*-Gewebekulturplatte dienten nach Lyse in 500 μ l 0,1%iger SDS-Lösung und 20 s Ultraschallbehandlung der DNA-Bestimmung.

2.11 Insulin-Radioimmunoassay

Die Insulinkonzentrationen von Proben aus den Inkubationen zur Insulinsekretion und zum Insulingehalt von RINm5F-Zellen und aus Seren von Versuchstieren wurden mittels Insulin-Radioimmunoassay bestimmt. Das Prinzip des Radioimmunoassays basiert darauf, daß 125 I-markiertes Insulin und Insulin der Standards oder der Proben um eine begrenzte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren. Der Antikörper-Insulin-Komplex wird durch Polyethylenglycol präzipitiert. Ungebundenes 125 I-markiertes Insulin und unmarkiertes Insulin werden aus dem Fällungsüberstand entfernt. Die Menge des markierten Insulins im Präzipitat wird im γ -Zähler gemessen und verhält sich zur Menge des unmarkierten Insulins in den Proben umgekehrt proportional.

In 4-ml-Reagiergefäße wurden folgende Lösungen in der angegebenen Reihenfolge pipettiert:

50 µl	Probe oder Standard
50 µl	KR-Puffer + 1,5 % (w/v) Globulin
50 µl	KR-Puffer + Meerschweinchen-Anti-Insulin-Antikörper (Verdünnung 1:200.000)
100 µl	KR-Puffer + ¹²⁵ I-markiertes Insulin, 250 Bq

Nach einer 16-20 stündigen Inkubation der Proben bei 4 °C wurde der Insulin-Antikörperkomplex mit 500 µl einer 26%igen PEG-6000-Lösung für 15 min bei RT gefällt. Danach wurden die Proben bei 5.000 g für 15 min zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Die radioaktive Strahlung der Pellets wurde im γ -Zähler gemessen. Die Ratteninsulin-Standards wurden in Dreifachbestimmung in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8 ng Insulin/ml.

Aus den Meßwerten der Standards konnte nach nicht-linearer Regression eine Funktion berechnet werden, mit der die Insulinkonzentrationen der Probelösungen bestimmt wurden.

2.12 Fluorometrische Quantifizierung von DNA aus RINm5F-Zellen

Durch die fluorometrische Quantifizierung mit dem Farbstoff Hoechst 33258 ist es möglich, den DNA-Gehalt auch von rohen Zellhomogenaten ohne weitere Aufreinigung direkt sensitiv und reproduzierbar zu messen (Downs & Wilfinger 1983). Ermöglicht wird dies durch die hohe Affinität und Spezifität der Bindung des Farbstoffes Hoechst 33258 zur „großen Furche“ von DNA-Molekülen. Aus der Interaktion des Farbstoffs mit der DNA resultiert ein Farbkomplex, der bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm Licht von 450 nm emittiert.

Der Farbstoff Hoechst 33258 wurde kurz vor Gebrauch in TNE-Puffer gelöst (100 ng/ml TNE-Puffer).

TNE-Puffer (pH 7,4):

1 M	NaCl
5 mM	Tris
0,5 mM	EDTA

Zu 950 µl Farbstoff-Lösung in einer Quarzküvette wurden 50 µl Proben- oder Standard-Lösung pipettiert. Die Messung erfolgte bei RT mit dem Sprechtralfuorophotometer (Shimadzu RF-510). Als Standard wurde Heringssperma-DNA (Boehringer Mannheim) in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6 µg /50 µl.

Aus den Meßwerten der Standards konnte nach linearer Regression eine Funktion berechnet werden, mit der die DNA-Konzentrationen der Probelösungen bestimmt wurden.

2.13 Implantation von RINm5F-GK-Zellen in RNU- und NZNU-Ratten

Als Empfängertiere für die Implantation von RINm5F-GK-Zellen wurden *Athymic Rowett Nude Hfh11^{tmu}* (RNU) und *Athymic New Zealand Hfh11^{tmu}* (NZNU) Ratten mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen gewählt. Tiere dieser Stämme sind immundefizient, so daß keine Abstoßungsreaktion nach der Implantation der Zellen zu erwarten war. Die Tiere wurden im Zentralen Tierlabor der Medizinische Hochschule Hannover gezüchtet und gehalten.

2.13.1 Haltung der Versuchstiere

Für die Implantation wurden 9 Wochen alte weibliche RNU- und NZNU-Ratten verwendet (150–200 g Körpergewicht), die unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Makrolon Größe III) bei 21 ± 2 °C mit 12stündigem Tag-Nacht-Wechsel gehalten wurden. Die Tiere erhielten das autoklavierte pelletierte Alleinfuttermittel Altromin 1324 (Altromin).

Inhaltsstoffe von Altromin 1324:

50,00 %	Kohlenhydrate
19,00 %	Rohprotein
0,90 %	Lysin
4,00 %	Rohfett
6,00 %	Rohfaser
7,00 %	Rohasche
0,90 %	Calcium
0,70 %	Phosphor

Zusatzstoffe von Altromin 1324 je kg:

15.000 i.E.	Vitamin A
600 i.E	Vitamin D3
75 mg	Vitamin E
5 mgg	Kupfer

Die Tiere hatten freien Zugang zum Futter und zu sterilem Leitungswasser.

2.13.2 Messung von Blutglucose und Körpergewicht implantierter *RNU*- und *NZNU*-Ratten

Die Messung des Blutzuckers der Versuchstiere erfolgte mit dem Glucometer Elite (Bayer) nach der Glucoseoxidase-Methode. Zur Blutentnahme wurde die Vene an der Schwanzspitze unter einer Reinraumwerkbank angeritzt und ein Tropfen Blut auf die Öffnung des Sensors gegeben. Die Blutzuckermessungen erfolgten zunächst am Tag der Stretozotocin-Injektion, an den beiden folgenden Tagen und dann dreimal wöchentlich montags, mittwochs und freitags. Bei Blutzuckerwerten unter 4 mmol/l wurde täglich gemessen.

Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde mit einer Laborwaage unter einer Reinraumwerkbank in den gleichen zeitlichen Intervallen wie die Blutglucosemessungen bestimmt.

2.13.3 Induktion eines Diabetes mellitus bei *RNU*- und *NZNU*-Ratten durch Streptozotocin und Implantation von RINm5F-GK-Zellen

Zur Induktion eines Diabetes mellitus bei *RNU*- und *NZNU*-Ratten wurde den Tieren 40 mg Streptozotocin/kg Körpergewicht unter Ethernarkose in die Schwanzvene injiziert. Das Streptozotocin war in einem Citrat-Puffer (100 mM, pH 4,5) gelöst und wurde bis zum Gebrauch bei 0 °C gelagert. Vor und nach der Streptozotocininjektion wurden die Tiere 4 h gehungert. 4–6 Tage nach Diabetesinduktion (Blutglucosekonzentration > 14 mmol/l) wurden je Tier 10^7 RINm5F-GK-Zellen oder untransfizierte RINm5F-Kontrollzellen durch Injektion mit einer Kanüle subscapsulär implantiert.

2.13.4 Glucosebelastung von implantierten *RNU*- und *NZNU*-Ratten durch orale Glucosegaben

Wenn die Blutglucose-Konzentrationen im Bereich von 5–10 mmol/l lagen, wurde ein Glucosetoleranztest bei den implantierten Tieren durchgeführt. Hierzu wurde den Tieren nach 4stündigem Fasten 1 g Glucose pro kg Körpergewicht oral über eine Sonde verabreicht. 0, 30, 60 und 120 min nach Glucoseverabreichung wurden die Blutglucosekonzentrationen mit dem Glucometer Elite (s. Abschnitt 2.13.2) gemessen und Blutproben zur Bestimmung der Seruminsulin-Konzentrationen mittels Radioimmunoassay gesammelt.

2.13.5 Explantation von RINm5F-GK-Zellen aus *RNU*- und *NZNU*-Ratten

Die Versuchstiere wurden getötet, wenn die Blutglucosekonzentration unter 2 mmol/l abgesunken war. Der Tumor wurde den Tieren entnommen und aus dem Gewebe RNA isoliert. Die Genexpression von Glucokinase, GLUT2 und Insulin wurde durch *Northern-Blot*-Analysen überprüft.

2.14 Digitoninpermeabilisierung von RINm5F-GK-Zellen hoher Passage

Die Digitoninpermeabilisierungen von RINm5F-GK-Zellen hoher Passage wurden wie von Agius *et al.* (1993) beschrieben mit geringen Modifikationen durchgeführt. 400.000 RINm5F-GK-Zellen wurden auf einer 6-cm-Gewebekulturschale ausgesät und für 24 h

unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden mit 1, 3, 5, und 10 µg/ml Digitonin in 1 ml Glucokinase-Reaktionspuffer für 5 min bei RT permeabilisiert.

Reaktionspuffer (pH 7,4):

20 mM	HEPES
125 mM	KCl
7,5 mM	MgCl ₂

Anschließend wurde das Eluat abgezogen und mit folgenden Substanzen sublimentiert:

5 mM	Na-ATP
0,5 mM	NAD
700 U/l	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i>

Die Glucokinase-Phosphorylierungsaktivitäten wurden photometrisch bei 340 nm gemessen. Alternativ wurde das Protein der Eluate für *Western-Blot*-Analysen mit Aceton gefällt und in Probenpuffer für den Protein-PAGE aufgenommen (Abschnitt 2.6.4).

Die auf den Gewebekulturschalen verbliebenen permeabilisierten Zellmatrizes wurden mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 in Glucokinase-Reaktionspuffer für 5 min bei RT lysiert. Die Glucokinase-Phosphorylierungsaktivitäten wurden nach dem Hinzufügen von ATP, NAD und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zum Lysat (s. o.) photometrisch bestimmt. Alternativ wurde das Protein der Lysate ebenfalls für *Western-Blot*-Analysen mit Aceton gefällt und in Probenpuffer für den Protein-PAGE aufgenommen.

2.15 Inaktivierung von Eluaten permeabilisierter RINm5F-GK-Zellen durch Hitze und proteolytischen Verdau

Das durch Digitoninpermeabilisierung gewonnene Eluat von RINm5F-Gk Zellen wurde für 5 min auf 95 °C erhitzt, bzw. für 5 min bei 25 °C mit 0,4 mU/ml immobilisierter Proteinase K *Beats* versetzt. Nach Ablauf der 5 min wurden die Proteinase K *Beats* abzentrifugiert und die Proteolyse somit gestoppt. Anschließend wurde dem Eluat rekombinante B-Zellglucokinase (20 mOD) hinzugefügt (Tiedge *et al.* 1997). Nach Zugabe von 0,5 % (v/v) Triton X-100 wurde die Glucokinase-Enzymaktivität photo-

metrisch bestimmt. Als Kontrollen wurden die Enzymaktivitäten des unbehandelten RINm5F-GK-Eluats sowie des unbehandelten Eluats nach Zugabe von 0,5 % (v/v) Triton X-100 bestimmt.

2.16 Inkubationen von RINm5F-GLUT2-Zellen hoher Passage mit Alloxan und Streptozotocin

Für Untersuchungen der Toxizität von Alloxan und Streptozotocin auf RINm5F-GLUT2-Zellen hoher Passage wurden 50.000 transfizierte oder nicht-transfizierte RINm5F-Zellen in 100 μ l Zellkulturmedium pro *well* in 96-*well*-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Zellen konnten für 18 h an der Gefäßoberfläche anwachsen, bis das Medium abgesaugt und gegen das mit der Testkomponente versetzte Inkubationsmedium ersetzt wurde (Kulturvolumen 100 μ l). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Alloxan und Streptozotocin bei pH 7,4 und 37 °C wurden die Substanzen als 10 mM Stammlösung in eiskalter 0,01 N HCl-Lösung angesetzt, bevor sie in entsprechender Verdünnung direkt zu den Zellen pipettiert wurden. 15 min vor der Inkubation der Zellen wurde das glucosehaltige RPMI-1640 Medium abgesaugt und gegen glucosefreies KR-Puffer, in dem auch die Inkubation erfolgte, getauscht. Nach 1 h wurde die Testlösung abgezogen und es folgte eine 18stündige Inkubation in RPMI-1640 Medium. Danach wurde der MTT-Vitalitätstest durchgeführt.

Für die Untersuchung des Glucosetransports von RINm5F-GLUT2-Zellen nach Alloxan- bzw. Streptozotocinexposition wurden die Zellen entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 2.9 kultiviert. Nach einer 15minütigen Vorinkubation der Zellen mit KR-Puffer ohne Glucose wurden Streptozotocin bzw. Alloxan aus einer 20fach konzentrierten Stammlösung (Lösemittel 0,01 N HCl) hinzu pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Glucoseaufnahme wie in Abschnitt 2.9 beschrieben durchgeführt.

Folgende Alloxan- und Streptozotocinkonzentrationen wurden verwendet:

RINm5F- / RINm5F-GK-Zellen	0 2 4 6 8 10 mM Streptozotocin
RINm5F-GLUT2-Zellen	0 1 2 3 4 5 10 15 20 mM Streptozotocin

RINm5F- / RINm5F-GK-Zellen	0	2,5	5,0	7,5	10	12,5	15	20 mM Alloxan
RINm5F-GLUT2-Zellen	0	2,5	5,0	7,5	10	12,5	15	20 mM Alloxan

2.17 MTT-Vitalitätstest

Der von Mosmann (Mosmann 1983) beschriebene MTT-Test beruht auf der Aktivitätsmessung mitochondrialer Dehydrogenasen. Dabei wird der Tetrazoliumring des schwach gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromids (MTT) durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen. Der entstehende dunkelblaue Formazanfarbstoff ist in wässriger Lösung unlöslich und lagert sich daher in den Zellen ab. Durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels (DMSO) können sowohl die Zellen lysiert als auch das Formazan in Lösung gebracht werden. Die Färbung dieser Lösung kann spektralphotometrisch ausgewertet werden. Eine geringe Farbintensität entspricht einer geringen Anzahl intakter Mitochondrien. Diese Funktionsminderung kann sowohl durch eine verminderte Zellproliferation als auch durch eine Schädigung der Zelle und die damit verbundene Funktionsbeeinträchtigung des Mitochondriums verursacht werden. Die Durchführung des MTT-Tests erfolgte nach Inkubation mit der Testsubstanz in der 96-*well*-Zellkulturplatte. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 100 μ l MTT-Lösung bei 37 °C inkubiert. Die MTT-Stammlösung wurde unmittelbar vor Durchführung des MTT-Tests im Verhältnis 1:10 mit glucosehaltigem KR-Puffer verdünnt. Die Inkubation wurde nach Erreichen einer ausreichenden MTT-Färbung unterbrochen und die MTT-Lösung vollständig entfernt. Die Zellen wurden anschließend durch 100 μ l DMSO lysiert. Gleichzeitig löste sich das MTT-Präzipitat. Die Messung der Absorption erfolgte bei 562 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) im Mikroplattenphotometer (Anthos ht III). Die Berechnungen der Vitalitäten bezogen sich jeweils auf unbehandelte Zellen.

MTT-Stammlösung :

50 mg MTT

10 ml PBS

Sterilfiltration durch Spritzenvorfilter (Porengröße 0,2 µm)

2.18 Statistische Auswertung

Korrelationsanalysen sind mit dem Computerprogramm Prism 2.01 (GraphPad) durchgeführt worden. Bei den Auswertungen wurden nur Kurvenanpassungen berücksichtigt, deren r^2 -Wert $> 0,95$ war.

Die Signifikanzprüfung erfolgte durch einen zweiseitigen Student's t-Test für ungleiche Varianzen mit dem Computerprogramm Excel 97 (Microsoft).

3 Resultate

Für die Vermittlung der glucoseinduzierten Insulinsekretion der B-Zelle des Pankreas spielen die Strukturen Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter eine entscheidende Rolle. Sie sind in der Lage, extrazelluläre millimolare Glucosekonzentrationen an entsprechende glykolytische Fluxänderungen zu koppeln. Durch Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten wird der ATP-sensitive Kaliumkanal geschlossen, wodurch eine Depolarisation der Plasmamembran ausgelöst wird. Diese initiiert die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle und dadurch eine Erhöhung der intrazellulären freien Calciumkonzentration. Der Einstrom von Calciumionen triggert die Exozytose von Insulingranula und somit die Insulinsekretion. Bei der in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Insulinomzelllinie RINm5F ist diese Stimulus-Sekretionskopplung gestört. Zwar bilden und sezernieren die Zellen Insulin, jedoch ist die Insulinsekretion nicht abhängig von der extrazellulären Glucosekonzentration. Ursache für die fehlende glucoseinduzierte Insulinsekretion in RINm5F-Zellen könnte die mangelnde Genexpression von GLUT2-Glucosetransporter und Glucokinase sein.

3.1 Charakterisierung von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen niedriger Passage

Die folgenden Untersuchungen wurden mit der insulinproduzierenden Gewebekulturzelllinie RINm5F in der Passage 19 durchgeführt. Es war Ziel der Versuche, Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter in diesen Zellen überzuexprimieren und die Überexpression durch *Northern*- und *Western-Blot*-Analysen nachzuweisen. In enzymkinetischen Untersuchungen positiver Zellklone wurden die Auswirkungen der Überexpression auf die Glucosephosphorylierung der Zellen bestimmt und durch Messung der Glucoseoxidation wurde eine Kopplung millimolarer Glucosekonzentration an den oxidativen Metabolismus nachgewiesen. Die 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahmekinetiken von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen wurde mit denen nicht-transfizierter RINm5F-Zellen verglichen. Mit Hilfe des Radioimmunoassays wurden Insulinsekretion und Insulingehalt transfizierter und nicht-transfizierter RINm5F-Zellen bestimmt.

3.1.1 Nachweis der Genexpression von Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter in transfizierten RINm5F-Zellen niedriger Passage

Bei der Genexpression wird die auf der DNA in Form einer Nukleotidsequenz gespeicherte genetische Information zunächst in RNA transkribiert, um dann in der Proteinbiosynthese in eine Aminosäuresequenz übersetzt zu werden (Translation). Die Charakterisierung der Überexpression von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter in RINm5F-Zellen erfolgte auf der transkriptionellen Ebene durch *Northern-Blot*-Analysen und auf der translationellen Ebene durch *Western-Blot*-Analysen. Die *Northern-Blot*-Analyse diente nach der Transfektion und der Selektion von G418-resistenten Zellklonen als erste Nachweismethode zur Identifikation positiver, d.h. Glucokinase- oder GLUT2-überexprimierenden Zellklone.

3.1.1.1 *Northern-Blot*-Analyse von Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen

Das Enzym Glucokinase (Hexokinase IV) wird in der Leber und in den B-Zellen des Pankreas exprimiert. Es katalysiert im ersten Schritt der Glykolyse die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat. Im Vergleich zu den hochaffinen Isoenzymen Hexokinase I-III (K_m 20-130 μ M) besitzt die Glucokinase mit 8 mM Glucose einen weitaus höheren K_m -Wert. Dieser hohe K_m -Wert ist Voraussetzung für eine glucoseinduzierte Insulinsekretion in der B-Zelle des Pankreas, bei dem die extrazelluläre Glucosekonzentration über die Glucokinase an den metabolischen Flux gekoppelt ist und an dessen Endpunkt die Exozytose des Peptidhormons Insulin steht.

Durch den Einsatz von spezifischen DIG-UTP markierten *Antisense*-cRNA-Gensonden war es möglich, mRNA bis zu einer Nachweisgrenze von 0,5 pg zu detektieren. Die Expression der Glucokinase in RINm5F-Zellen dieser niedrigen Passage lag unterhalb dieser Detektionsgrenze (Abb. 3.1). Durch die Transfektion der RINm5F-Zellen mit der für die menschliche Glucokinase codierenden cDNA unter transkriptioneller Kontrolle des CMV-Promotors konnte die Expression auf ein über der Leber liegendes Niveau gesteigert werden. Die detektierte mRNA hatte eine Länge von 2,4 kb.

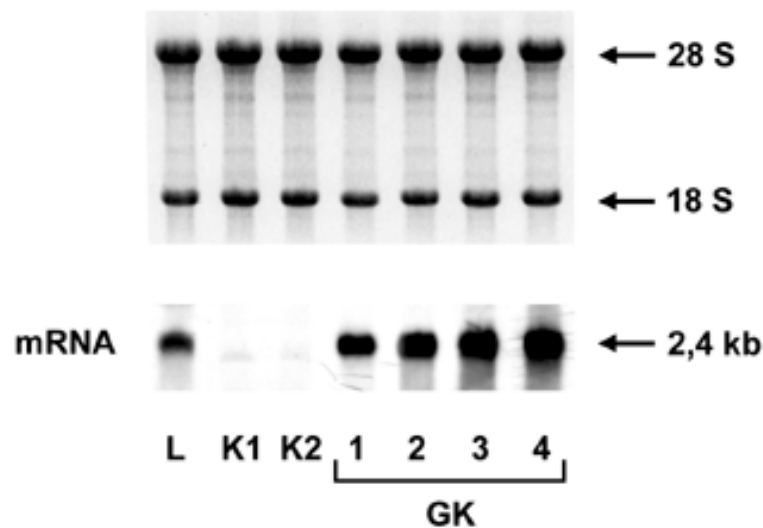


Abb. 3.1: *Northern-Blot-Analyse der Glucokinase-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber*

L = Leber, K1 = nicht-transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = RINm5F-Zellen mit dem Vektor pcDNA3 stabil transfiziert, 1 - 4 = 4 unterschiedliche RINm5F-Zellklone nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pcDNA3-GK. Aufgetragen wurden 10 µg RNA/Bahn. Die RNA wurde mit einer für Glucokinase spezifischen cRNA-Gensonde unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die 28S- und 18S-ribosomalen Banden zeigen die gleichmäßige Beladung des Agarosegels. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

Um einen Einfluß der Transfektion *per se* auf die Genexpression der Glucokinase auszuschließen, wurde die RNA von Zellen, die mit dem Expressionsvektor pcDNA3 ohne cDNA transfiziert worden waren, als Kontrolle eingesetzt (*Mock-Transfektanden*) (Abb. 3.1, K2). Bei diesen Zellen war ebenfalls wie bei den nicht-transfizierten RINm5F-Zellen keine Glucokinasegenexpression nachweisbar. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Agarosegels dienten die 18S- und 28S-ribosomalen Banden.

3.1.1.2 *Western-Blot-Analyse von Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen*

In einem nächsten Schritt wurde die Proteinexpression der humanen B-Zellglucokinase in transfizierten RINm5F-Zellklonen in der *Western-Blot-Analyse* untersucht. Die B-Zellglucokinase des Menschen und die Leberglucokinase der Ratte sind zu über 90 % homolog und unterscheiden sich nicht in ihren enzymatischen Eigenschaften. Aufgrund der hohen Homologie der Glucokinase-Isoformen war es möglich, die humane B-Zellglucokinase mit einem gegen Rattenleberglucokinase gerichteten aus Kaninchenserum gewonnenen spezifischen polyklonalen Antiserum im *Western Blot* nachzuweisen. Der

Antikörper, der im Institut für klinische Biochemie gegen das aufgereinigte Glucokinaseprotein erzeugt wurde, zeigte keine Kreuzreaktion zu den 100-kDa-Hexokinaseisomeren I-III (Daten nicht abgebildet).

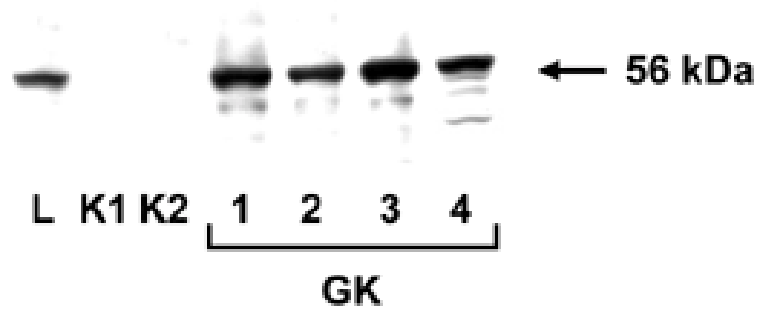


Abb. 3.2: *Western-Blot-Analyse der Glucokinase-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber*

L = Rattenleber, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = RINm5F-Zellen mit dem Vektor pcDNA3 stabil transfiziert, 1 - 4 = 4 unterschiedliche RINm5F-Zellklone nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pcDNA3-GK. Aufgetragen wurden 10 µg Protein/Bahn. Das Protein aus Zellhomogenaten wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Glucokinase-Proteinexpression wurde mit einem spezifischen gegen Glucokinase gerichteten Antikörper detektiert. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot von 4 unabhängigen Experimenten.

Das Glucokinaseprotein war nach der Transfektion mit dem pcDNA3-GK-Expressionsvektor in den Zellhomogenaten überexprimierender RINm5F-Zellen und in den Rattenleberhomogenaten, die als Referenz eingesetzt wurden, als deutliche Bande bei 56 kDa zu detektieren. Die Expressionsstärke der RINm5F-GK-Zellen erreichte dabei ein der Leber entsprechendes Niveau (Abb. 3.2). Die Glucokinase-Expression in nicht-transfizierten RINm5F-Zellen lag wie bei der durchgeführten *Northern-Blot-Analyse* unterhalb der Nachweisgrenze. Auch in RINm5F-Zellen, die mit dem pcDNA3-Vektor ohne cDNA transfiziert worden waren, konnte keine Glucokinase-Expression nachgewiesen werden.

3.1.1.3 *Northern-Blot-Analyse von GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen*

Der GLUT2-Glucosetransporter gehört zur Familie der Säugetierglucosetransporter, die Glucose entlang eines Konzentrationsgradienten durch erleichterte Diffusion transportieren und wird in der Leber, Niere, im Dünndarm und in den pankreatischen B-Zellen exprimiert (Bell *et al.* 1990; Thorens *et al.* 1990b; Bell *et al.* 1991; Thomas *et al.* 1992; Thorens *et al.* 1992; Bell *et al.* 1993). Das GLUT2-Glucosetransporter-Gen wird als 2,8-

kb-mRNA-Spezies sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte in allen genannten Geweben exprimiert (Thorens *et al.* 1988; Tiedge & Lenzen 1991). Alle bislang vorliegenden Studien stützen den Schluß, daß nur eine Expression des GLUT2-Glucose-transporters in der B-Zelle des Pankreas zusammen mit der Glucokinase einen einwandfreien Glucose-Erkennungsapparat für die Vermittlung der glucoseinduzierten Insulinsekretion in physiologischen millimolaren Konzentrationen darstellt.

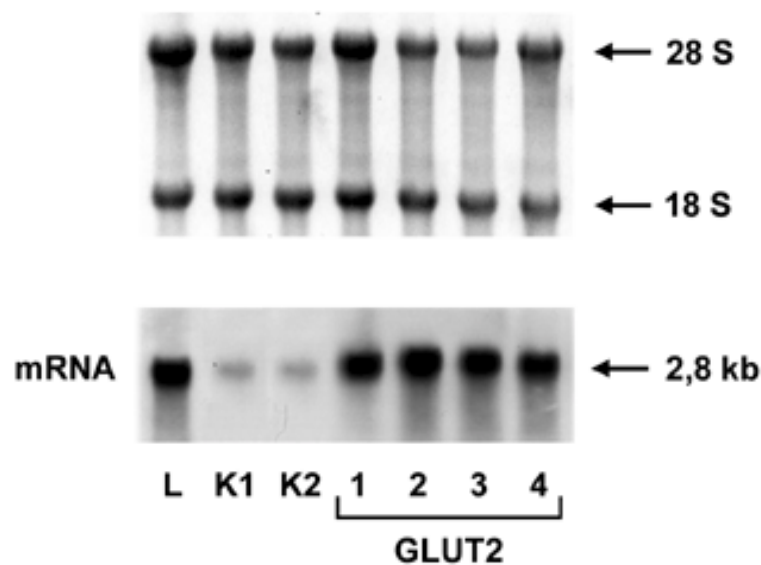


Abb. 3.3: Northern-Blot-Analyse der GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber

L = Leber, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = RINm5F-Zellen mit dem Vektor pcDNA3 stabil transfiziert, 1 - 4 = 4 unterschiedliche RINm5F-Zellklone nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pcDNA3-GK. Aufgetragen wurden 10 µg RNA/Bahn. Die RNA wurde mit einer für GLUT2-spezifischen cRNA-Gensonde unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die 28S- und 18S-ribosomalen Banden zeigen die gleichmäßige Beladung des Agarosegels. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz zur Glucokinase konnte das 2,8-kb-Transkript des GLUT2-Glucose-transporters auch in nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen im *Northern Blot* nachgewiesen werden (Abb. 3.3, K1). Das Expressionsniveau lag aber deutlich unterhalb des Niveaus der Leber. Durch Transfektion von RINm5F-Zellen mit der im eukaryontischen Expressionsvektor subklonierten GLUT2-Glucosetransporter-cDNA konnte eine mit der Leber vergleichbare Expressionsstärke erreicht werden. Bei RINm5F-Zellen, die mit dem Vektor pcDNA3 ohne cDNA transfiziert wurden, war keine Verän-

derung der Expression des GLUT2-Glucosetransporters im *Northern Blot* festzustellen (Abb. 3.3, K2).

3.1.1.4 *Western-Blot-Analyse von GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen*

Für die *Western-Blot*-Analysen des GLUT2-Glucosetransporters dienten Mikrosomenpräparationen, die in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden. Die Mikrosomenpräparation erlaubte eine ca. 20fache Anreicherung des GLUT2-Proteins im Vergleich zu einem Zellhomogenat. Detektiert wurde der GLUT2-Glucosetransporter im *Western Blot* mit einem spezifischen gegen das C-terminale Ende des Proteins gerichteten Antikörper (Aminosäuren 513-522, Thorens *et al.* 1988) als 57- und 60-kDa-Protein. Die bereits von Thorens *et al.* 1990 beschriebenen Doppelbanden sind nicht auf eine mangelnde Selektivität des Antikörpers zurückzuführen sondern vermutlich auf Unterschiede in der Glycosylierung oder Phosphorylierung oder in der Proteolyse des Proteins.

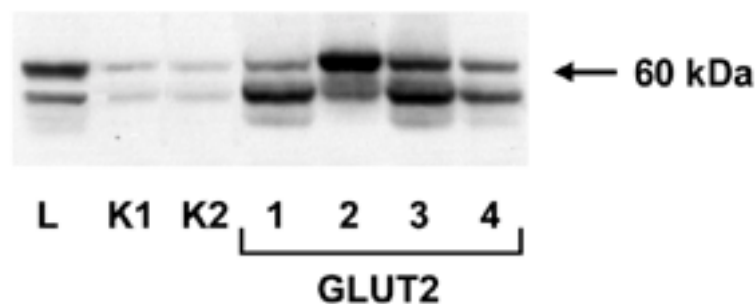


Abb. 3.4: *Western-Blot-Analyse der GLUT2-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber*

L = Rattenleber, K1 = nicht-transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = RINm5F-Zellen mit dem Vektor pcDNA3 stabil transfiziert, 1 - 4 = 4 unterschiedliche RINm5F-Zellklone nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pcDNA3-GLUT2. Aufgetragen wurden 10 µg Protein/Bahn. Das Protein aus Mikrosomenpräparationen wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die GLUT2-Proteinexpression wurde mit einem spezifischen gegen GLUT2 gerichteten Antikörper detektiert. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot von 4 unabhängigen Experimenten.

Wie schon bei der *Northern-Blot*-Analyse konnte auch im *Western Blot* bei nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen eine im Vergleich zur Rattenleber schwache GLUT2-Glucosetransporterexpression nachgewiesen werden (Abb. 3.4, K1). Die Expression blieb durch eine *Mock*-Transfektion (Vektor pcDNA3 ohne cDNA) unverändert (Abb.

3.4, K2). Durch die Transfektion mit dem Vektor pcDNA3-GLUT2 konnte auch auf der Proteinebene eine mit der Leber vergleichbare Überexpression des GLUT2-Glucose-transporters erreicht werden.

3.1.2 Glucosephosphorylierung von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen niedriger Passage

Als Nachweis für die Überexpression eines funktionsfähigen Glucokinase-Enzymproteins in RINm5F-Zellen wurden die Glucosephosphorylierungs-Aktivitäten von Zellhomogenaten spektralphotometrisch bestimmt. Die Messung der Glucosephosphorylierungsaktivitäten erlaubte im Gegensatz zur semiquantitativen Charakterisierung der Glucokinase-Expression transfizierter RINm5F-Zellen durch *Northern-* und *Western-Blot*-Analysen eine quantitative Beurteilung der Glucokinaseüberexpression.

Da für die glucoseinduzierte Insulinsekretion der pankreatischen B-Zelle vermutlich nicht nur die absolute Glucokinaseaktivität, sondern das Verhältnis der Aktivitäten von Glucokinase und Hexokinase wichtig ist, wurde auch die Phosphorylierungsaktivität der Hexokinase in den Zellhomogenaten gemessen.

Die Phosphorylierungsaktivitäten wurden in einem enzymgekoppelten photometrischen Test gemessen. Bei der Phosphorylierung des Substrats D-Glucose wird durch Glucokinase bzw. Hexokinase Glucose-6-phosphat gebildet. Dieses wird durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton umgesetzt. Das durch die Dehydrogenisierung entstehende NADH kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden. Aufgrund der unterschiedlichen K_m -Werte von Hexokinase (20-130 μM) und Glucokinase (ca. 8 mM) für das Substrat Glucose kann durch die Wahl von 1 mM und 100 mM Glucose im photometrischen Assay zwischen den Phosphorylierungsaktivitäten von Hexokinase und Glucokinase unterschieden werden.

Da die Glucokinase-Enzymaktivitäten in zellulären Homogenaten selbst bei Lagerung auf Eis einen raschen Aktivitätsverlust von 50-60 % innerhalb einer Stunde zeigten, wurden die Zellen durch Ultraschall auf Eis innerhalb von 30 s homogenisiert und das zelluläre Homogenat ohne weitere Fraktionierung unmittelbar in die spektralphotometrische Bestimmung der Glucosephosphorylierungsaktivitäten eingesetzt. Der DNA-Gehalt wurde anschließend aus dem Küvetteninhalt bestimmt.

Zelltyp	Glucokinase (U/g DNA)	Hexokinase (U/g DNA)	Anteil der Glucokinase an der Phosphorylierungsaktivität (%)
RINm5F (Kontrolle)	13 ± 3 (4)	157 ± 14 (4)	8
RINm5F-GK	153 ± 17 (6)*	131 ± 24 (6)	54
RINm5F-GLUT2	19 ± 8 (4)	308 ± 18 (4)*	6
Pankreasinseln der Ratte	13 ± 2 (9)	8 ± 2 (9)*	62

Tab. 3.1: Effekt der Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression auf die Aktivitäten glucosephosphorylierender Enzyme in RINm5F-Zellen

Die Enzymaktivitäten von Zellhomogenaten wurden photometrisch mit einem enzymgekoppelten Assay bei 37 °C gemessen. Die Mittelwerte ± SEM von 4-6 unabhängigen Experimenten sind in U/g DNA angegeben. * Signifikantsniveau $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle.

RINm5F-Gewebekulturzellen weisen im Vergleich zur Pankreasinsel eine 20fach höhere Hexokinaseaktivität auf (Tab. 3.1). Die Glucokinaseaktivitäten hingegen sind in beiden Zelltypen mit 13 U/g DNA gleich. Der relative Mangel an Glucokinase in RINm5F-Zellen wird durch den niedrigen Anteil der Glucokinase an der Phosphorylierungsaktivität von 8 % verdeutlicht. Durch die Überexpression der Glucokinase in RINm5F-Zellen konnte die Enzymaktivität im Vergleich zu nicht-transfizierten RINm5F-Zellen um den Faktor 12 gesteigert werden. Der Anteil der Glucokinase an der Phosphorylierungsaktivität konnte dadurch auf 54 % erhöht werden und lag damit im Bereich der Pankreasinseln (62 %). Trotz signifikant erhöhter Hexokinaseaktivitäten in GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen veränderte sich der Anteil der Glucokinase an der Phosphorylierungsaktivität mit 6 % nur unwesentlich im Vergleich zu nicht-transfizierten RINm5F-Zellen.

3.1.3 Glucoseoxidation von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen niedriger Passage

Um die Kopplung von millimolaren Glucosekonzentrationen an den oxidativen Metabolismus zu charakterisieren, wurde die Glucoseoxidation von nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen, Glucokinase- und GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen gemessen. Hierzu wurden die Zellen mit unterschiedlichen D-[U-¹⁴C]-Glucosekonzentrationen inkubiert und die Menge des gebildeten ¹⁴CO₂ im β-Szintillationszähler gemessen.

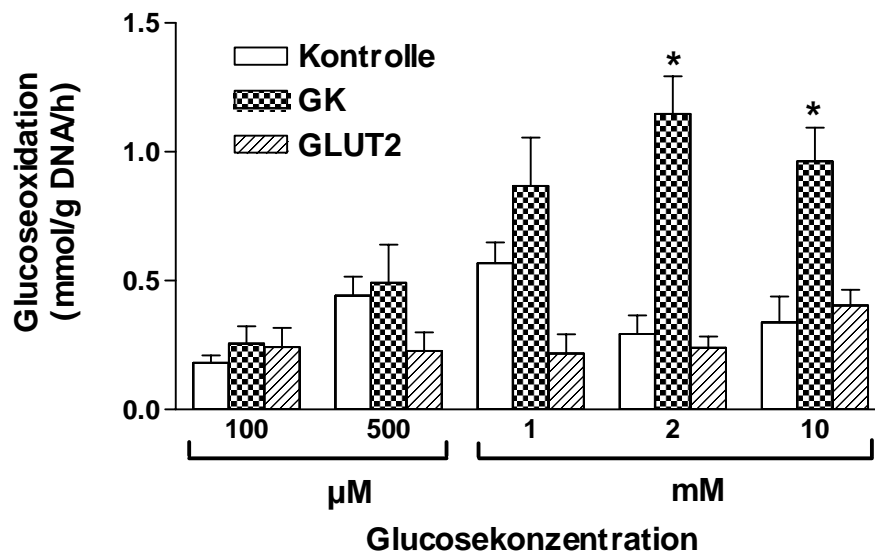


Abb. 3.5: Effekt der Überexpression von Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter auf die Glucoseoxidation in RINm5F-Zellen

Kontrolle = RINm5F-Zellen, GK = RINm5F-GK-Zellen, GLUT2 = RINm5F-GLUT2-Zellen. Die Zellen wurden für 60 min bei 37 °C mit unterschiedlichen D-[U-¹⁴C]Glucosekonzentrationen inkubiert. Die Menge des gebildeten ¹⁴CO₂ wurden im β-Szintillationszähler gemessen und diente zur Berechnung der Glucoseoxidationsraten. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 4-6 unabhängigen Experimenten. *Signifikantsniveau $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle.

Während nicht-transfizierte RINm5F-Zellen einen Anstieg der Glucoseoxidation um den Faktor 3 zwischen 100 µM und 1 mM zeigten, blieben die Werte für GLUT2-überexprimierende RINm5F-Zellen über den gesamten Konzentrationsbereich von 100 µM bis 10 mM nahezu unverändert. Nur Glucokinase-überexprimierende RINm5F-Zellen zeigten bei millimolaren Konzentrationen von 2 bis 10 mM Glucose einen signifikanten Anstieg der Glucoseoxidation um den Faktor 4, verglichen mit nicht-

transfizierten RINm5F-Kontrollzellen. Dieses Ergebnis belegt, daß die überexprimierte Glucokinase in den RINm5F-Zellen in der Lage ist, millimolare Glucosekonzentrationen effizient an den oxidativen Metabolismus zu koppeln.

Bei 10 mM Glucose war eine Abnahme der Glucoseoxidation im Vergleich zu 2 mM Glucose in RINm5F-GK-Zellen zu verzeichnen, die durch eine verstärkte Hemmung der Hexokinase durch erhöhte Glucose-6-phosphatkonzentrationen zu erklären ist.

3.1.4 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen niedriger Passage

Um die Funktion des in RINm5F-Zellen konstitutiv exprimierten GLUT2-Glucosetransporters zu überprüfen, wurden kinetische Untersuchungen zur Aufnahme von 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose durchgeführt. 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose wird von den Glucosetransportern GLUT2 und GLUT1 wie Glucose durch erleichterte Diffusion in die Zelle transportiert, kann jedoch im Gegensatz zur Glucose in der Zelle nicht metabolisiert werden und reichert sich so an. Die Menge der von den Zellen akkumulierten 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose wurde mittels β -Szintillationszähler gemessen.

Aus den kinetischen Daten konnten die initiale Geschwindigkeit der 3-O-Methyl[1-³H]-Glucoseaufnahme und die Zeit bis zur halbmaximalen Gleichgewichtseinstellung berechnet werden.

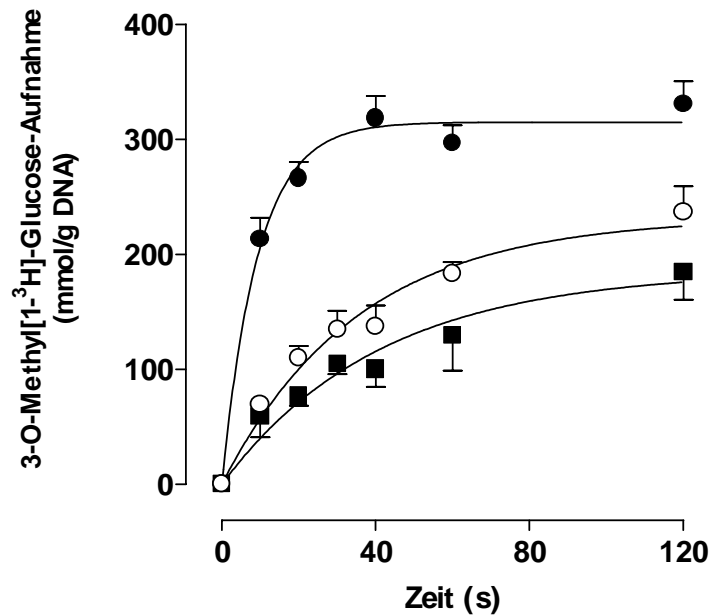


Abb. 3.6: Effekt der Überexpression von Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter auf die 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme von RINm5F-Zellen

● = RINm5F-GK-Zellen, ○ = RINm5F-Zellen, ■ = RINm5F-GK-Zellen. Die Zellen wurden bei 37 °C mit 10 mM 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose (10 μCi/ml) in KR-Puffer für 10-120 s inkubiert. Die von den Zellen aufgenommene 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose wurde im β-Szintillationszähler quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 4 unabhängigen Experimenten.

Die konstitutive Expression des GLUT2-Glucosetransporters in RINm5F-Zellen niedriger Passage konnte nicht nur in Western- und *Northern-Blot*-Analysen, sondern auch in den 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahmekinetiken gezeigt werden. Die initiale Geschwindigkeit der 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme ist bei nicht-transfizierten RINm5F-Zellen mit hoher Passagenummer (Tab. 3.5) um mehr als 60 % niedriger als bei RINm5F-Zellen niedriger Passage (Tab. 3.2) und die Zeit bis zur halbmaximalen Gleichgewichtseinstellung ist um nahezu 30 % kürzer.

Weder die initiale Geschwindigkeit noch die Zeit bis zur halbmaximalen Gleichgewichtseinstellung der 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme wurden durch eine Überexpression der Glucokinase in RINm5F-Zellen beeinflusst (Tab. 3.2). Eine deutliche Linksverschiebung der 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahmekurve ergab jedoch die GLUT2-Überexpression in RINm5F-Zellen (Abb. 3.6).

3-O-Methyl[1- ³ H]-Glucose-Aufnahme		
Zelltyp	Initiale Geschwindigkeit (mol/g DNA/min)	Zeit bis zur halbmaximalen Gleichgewichtseinstellung (s)
RINm5F (Kontrolle)	0,42 ± 0,02	24,8 ± 3,1
RINm5F-GK	0,35 ± 0,06	28,5 ± 4,4
RINm5F-GLUT2	1,28 ± 0,11*	6,5 ± 0,9*

Tab. 3.2: Effekte der Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression auf die Charakteristika der 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme

Die initialen Geschwindigkeiten wurden aus den linearen Aufnahmephasen zwischen 0 und 10 s bei 10 mM 3-O-Methyl[1-³H]-Glucoseaufnahme berechnet. Die Zeit bis zur halbmaximalen Gleichgewichtseinstellung wurde mit der nicht-linearen Regressionsanalyse *one phase exponentiell association* aus den 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahmekinetiken in Abb. 3.6 berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 4 unabhängigen Experimenten. *Signifikantsniveau $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle.

Die initiale Geschwindigkeit der 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme war in GLUT2-überexprimierenden Zellklonen mit 1,28 mol/g DNA/min 3mal höher als in Kontrollzellen; die Zeit bis zur halbmaximalen Gleichgewichtseinstellung war mit 6,5 s auf ein Viertel verkürzt. Diese im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen schnelle Gleichgewichtseinstellung der intra- und extrazellulären Glucosekonzentration bestätigt die Expression des funktionsfähigen GLUT2-Glucosetransporters.

3.1.5 RT-PCR-Analyse der KIR6.2- und SUR1-Expression in RINm5F-Zellen niedriger Passage

Eine neben Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter wichtige Struktur für die glucoseinduzierte Insulinsekretion der pankreatischen B-Zelle ist wie bereits oben erwähnt der ATP-sensitive Kaliumkanal. Dieser Komplex besteht aus zwei Proteinen mit unterschiedlicher Funktion. Das KIR6.2-Protein bildet eine ATP-sensitive K⁺-selektive Pore in der Zellmembran. Das Sulfonylharnstoffrezeptorprotein (SUR1) dient als Regulator des Kir6.2 und verleiht ihm Sensitivität gegenüber Sulfonylharnstoffen, einer für die Therapie des Typ-II-Diabetes wichtigen Stoffklasse.

Die RT-PCR stellt eine sehr sensitive Methode dar, um die Genexpression auf der transkriptionellen Ebene nachzuweisen. Aus Zellen isolierte mRNA wird zunächst mit *Reverser Transkriptase* in cDNA „umgeschrieben“. Diese cDNA dient in einer nachfolgenden PCR als *Template*, um mit spezifischen Primern selektiv die cDNA eines gesuchten Gens zu amplifizieren. Das Amplifikat kann anschließend in einer Gelelektrophorese analysiert werden.

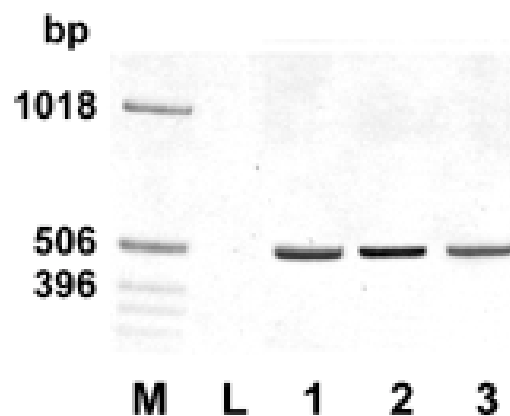


Abb. 3.7: RT-PCR-Analyse der Genexpression des KIR6.2 in RINm5F-Zellen

M = 1-kb-DNA-Leiter (Gibco), L = Amplifikation von Leber-cDNA, K = Negativ-Kontrolle ohne *Template*, 1 = Amplifikation von RINm5F-GK-cDNA, 2 = Amplifikation von RINm5F-GLUT2-cDNA, 3 = Amplifikation von RINm5F-cDNA. Die cDNA wurde aus 1 µg Gesamt-RNA synthetisiert und mit für den K_{ATP} -Kanal-spezifischen Primern mittels PCR amplifiziert. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1%igen TBE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Für die RT-PCR-Analyse der KIR6.2-Genexpression in RINm5F-Zellen wurde die cDNA aus 1 µg „umgeschriebener“ RNA eingesetzt. Für die Amplifikation (40 Zyklen) wurden spezifische PCR-Primer verwendet, die ein DNA-Fragment von 500-bp-Länge einschlossen. Das DNA-Fragment konnte sowohl für RINm5F-GK- und RINm5F-GLUT2-Zellen als auch nicht-transfizierte RINm5F-Kontrollzellen als singuläre Bande in einem 1%igen Agarosegel nachgewiesen werden (Abb. 3.7). In der Leber, die als Negativkontrolle diente, war keine Expression des KIR6.2 zu detektieren.

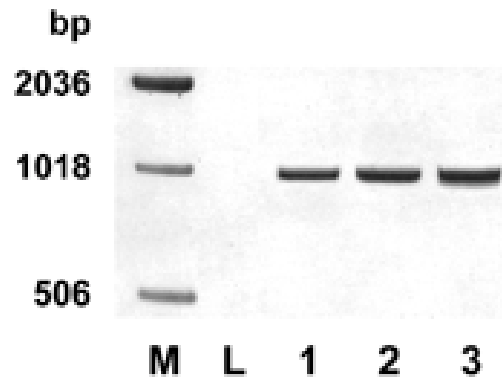


Abb. 3.8: RT-PCR-Analyse der Genexpression des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR1) in RINm5F-Zellen

M = 1-kb-DNA-Leiter (Gibco), L = Amplifikation von Leber-cDNA, K = Negativ-Kontrolle ohne *Template*, 1 = Amplifikation von RINm5F-GK-cDNA, 2 = Amplifikation von RINm5F-GLUT2-cDNA, 3 = Amplifikation von RINm5F-cDNA. Die cDNA wurde aus 1 µg Gesamt-RNA synthetisiert und mit für den Sulfonylharnstoffrezeptor spezifischen Primern mittels PCR amplifiziert. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1%igen TBE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Für die Analyse der Expression des SUR1 in RINm5F wurden spezifische PCR-Primer verwendet, die ein DNA-Fragment von 1 kbp lieferten. Dieses Fragment war nach der RT-PCR von RNA aus RINm5F-GK- und RINm5F-GLUT2-Zellen und aus nicht-transfizierten RINm5F-Zellen als singuläre Bande im Agarosegel nachweisbar (Abb. 3.8). Aus Leber-RNA konnte erwartungsgemäß keine für den SUR1 spezifische DNA amplifiziert werden (Abb. 3.8, L). Die Spezifität der RT-PCR-Analyse konnte so durch die Leberprobe gezeigt werden.

3.1.6 Glucoseinduzierte Insulinsekretion und Insulingehalt von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen niedriger Passage

Die Insulinsekretion und der Insulingehalt der RINm5F-Zellen wurden in Doppelbestimmung im Radioimmunoassay mit einem gegen Schweineinsulin gerichteten Antikörper und einem Ratteninsulinstandard gemessen.

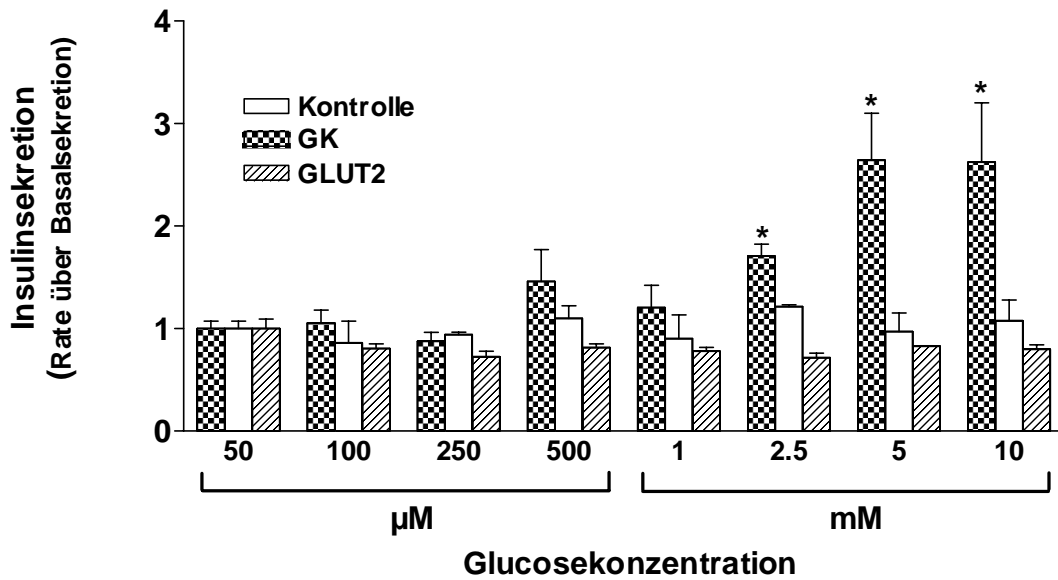


Abb. 3.9: Glucoseinduzierte Insulinsekretion von Glucokinase- und GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen

Kontrolle = RINm5F-Zellen, GK = RINm5F-GK-Zellen, GLUT2 = RINm5F-GLUT2-Zellen. Die Zellen wurden für 20 min statisch mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen in KR-Puffer inkubiert. Die Menge des in den Überstand sezernierten Insulins wurde mittels eines Radioimmunoassays bestimmt und ist als „Rate über der Basalsekretion“ angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten. * Signifikanzniveau $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle.

Weder nicht-transfizierte RINm5F-Kontrollzellen noch GLUT2-überexprimierende RINm5F-Zellen zeigten eine glucoseinduzierte Insulinsekretion im Konzentrationsbereich von 50 μ M bis 10 mM Glucose. Im Gegensatz dazu war bei Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen ein signifikanter Anstieg der Insulinsekretion zwischen 2,5 bis 10 mM Glucose festzustellen. Bei 5 und 10 mM Glucose war die Insulinsekretion 2,6mal höher als die Basalsekretion.

	Basale Insulinsekretion	Insulingehalt	Basale Insulinsekretion
Zelltyp	(pg/ μ g DNA/h)	(ng/ μ g DNA)	(% des Insulingehalts)
RINm5F (Kontrolle)	378 \pm 47 (8)	2,2 \pm 0,3 (8)	17
RINm5F-GK	104 \pm 13 (8)*	1,9 \pm 0,2 (8)	5
RINm5F-GLUT2	818 \pm 21 (8)*	1,9 \pm 0,1 (8)	43

Tab. 3.3: Effekt der Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression auf die basale Insulinsekretion und den Insulingehalt von RINm5F-Zellen

Die Zellen wurden für 20 min in KR-Puffer mit 50 μ M Glucose inkubiert. Die Menge des in den Überstand sezernierten Insulins wurde mittels eines Radioimmunoassays gemessen. Der Insulingehalt der Zellen wurde nach Extraktion mit saurem Ethanol im Radioimmunoassay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. *Signifikantsniveau $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle.

Der Insulingehalt der RINm5F-Zellen wurde durch die Überexpression von Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter nicht beeinflusst. Die Werte lagen zwischen 1,9 und 2,2 ng/ μ g DNA (Tab. 3.3). Bei der basalen Insulinsekretion jedoch ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zelltypen. Die Basalsekretion von RINm5F-GK-Zellen war verglichen mit den RINm5F-Kontrollzellen erniedrigt und betrug 104 pg/ μ g DNA/h. Anders war die Situation bei den RINm5F-GLUT2-Zellen. Hier war die basale Insulinsekretion mit 818 pg/ μ g DNA/h im Vergleich zu den RINm5F-Kontrollzellen mit 378 pg/ μ g DNA/h signifikant erhöht. Der Anteil des sezernierten Insulins am Insulingehalt war bei den RINm5F-GK-Zellen mit 5 % verglichen mit den anderen RINm5F-Zellklonen am niedrigsten. RINm5F-Kontrollzellen sezernieren 17 %, RINm5F-GLUT2-Zellen 43 % ihres Insulingehaltes.

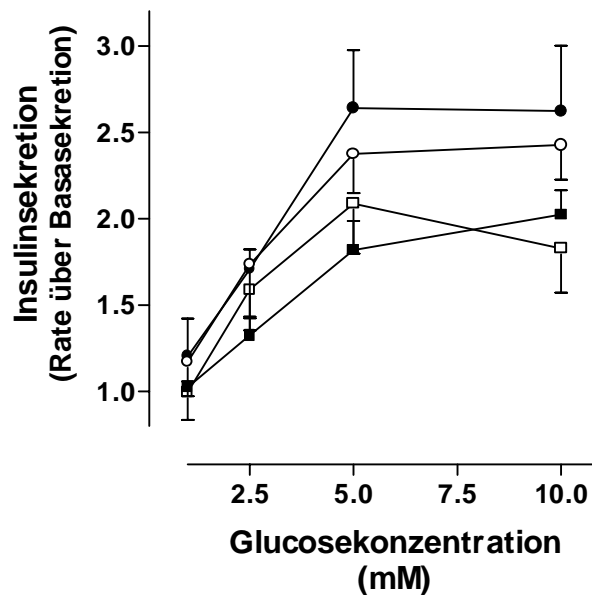


Abb. 3.10: Glucoseinduzierte Insulinsekretion von 4 unterschiedlichen RINm5F-GK-Zellklonen

● = RINm5F-GK-2, ○ = RINm5F-GK-1, ■ = RINm5F-GK-3, □ = RINm5F-GK-4. Die Zellen wurden für 20 min statisch mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen in KR-Puffer inkubiert. Die Menge des in den Überstand sezernierten Insulins wurde mittels Radioimmunoassays bestimmt und ist als „Rate über der Basalsekretion“ angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 6 unabhängigen Experimenten.

Um zu überprüfen, daß die Glucokinase-Überexpression in RINm5F-Zellen für die Glucoseresponsivität der Insulinsekretion verantwortlich war und nicht eine klonale Selektion, wurde von 4 unterschiedlichen Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellklonen die Insulinsekretion im Bereich von 1 bis 10 mM Glucose gemessen. Alle in Abb. 3.10 dargestellten RINm5F-GK-Zellklone zeigten eine Glucoseresponsivität bei millimolaren Glucosekonzentrationen. Die Glucoseresponsivität bewegte sich bei 10 mM Glucose zwischen dem 1,7- bis 2,6fachen der Basalsekretion.

3.2 Implantation von RINm5F-GK-Surrogatzellen in diabetische immundefiziente Ratten

Um die Möglichkeit unter Beweis zu stellen, daß gentechnisch veränderte RINm5F-GK-Surrogatzellen die Stoffwechsellage eines diabetischen Versuchstiers verbessern können, wurden Implantationsstudien durchgeführt. Für die Implantation in immundefiziente *RNU*- und *NZNU*-Ratten wurde der RINm5F-GK-Zellklon 2 mit der höchsten

Glucoseresponsivität ausgewählt. Die *RNU*- und *NZNU*-Ratten wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im Zentralen Tierlabor der Medizinische Hochschule Hannover gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Tiere erhielten das autoklavierte pelletierte Alleinfuttermittel Altromin 1324. Diabetes wurde in den Versuchstieren durch Injektion von 40 mg Streptozotocin je kg Körpergewicht in die Schwanzvene induziert. Die Ratten wurden vor und nach Injektion für 4 h vom Futter abgesetzt. 4–6 Tage nach Diabetesinduktion (Blutglucosekonzentration > 14 mmol/l) wurden je Tier 10^7 RINm5F-GK-Zellen oder nicht-transfizierte RINm5F-Kontrollzellen durch Injektion mit einer Kanüle subscapsulär implantiert.

3.2.1 Blutglucose- und Gewichtsverlauf diabetischer immundefizienter Ratten nach Implantation von RINm5F-GK-Surrogatzellen

Die Blutzuckermessungen erfolgten zunächst am Tag der Streptozotocin-Injektion, an den beiden folgenden Tagen und dann dreimal wöchentlich montags, mittwochs und freitags. Bei Blutzuckerwerten unter 4 mmol/l wurde täglich gemessen.

Die durchschnittliche Blutglucosekonzentration veränderte sich innerhalb von 5 Tagen bei Tieren, denen RINm5F-Kontrollzellen implantiert worden waren, nur unwesentlich. Vom 5. bis zum 11. Tag fielen die Blutglucosekonzentrationen drastisch von 20 mM auf 2 mM. Hervorgerufen wurde dies durch die Proliferation der Zellen und den damit verbundenen Anstieg der Seruminsulinkonzentrationen. Während dieser Zeit konnte auch makroskopisch ein Wachstum der Tumore beobachtet werden. Für die folgenden 7 Tage blieben die Blutglucosekonzentrationen nahezu konstant zwischen 2 und 3 mM. Bei Blutglucosewerten unter 2 mM für mehr als 24 h wurden die Tiere getötet und die gut sichtbaren Tumore explantiert.

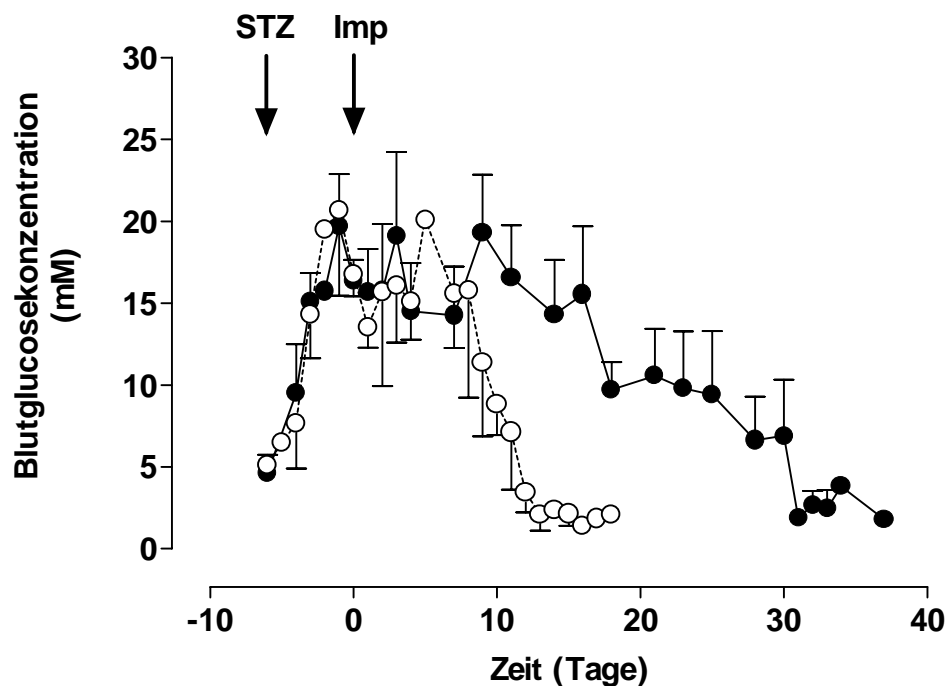


Abb. 3.11: Verlauf der Blutglucosekonzentrationen von immundefizienten Ratten nach Implantation von RINm5F-GK-Zellen und RINm5F-Zellen

Bei den Ratten wurde durch Injektion von Streptozotocin (STZ) 4-6 Tage vor der Implantation (Imp) von RINm5F-GK-Surrogatzellen (●) und RINm5F-Zellen (○) Diabetes induziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 5 bzw. 6 Tieren.

Bei RINm5F-GK implantierten Ratten setzte 10 Tage nach der Implantation eine Abnahme der Blutglucosekonzentrationen von 20 mM auf 10 mM ein. Im Zeitraum von 15 bis 35 Tagen war eine fortschreitende Normalisierung festzustellen. Die kontinuierliche Abnahme der Blutglucosekonzentrationen der Tiere, denen RINm5F-GK-Zellen implantiert worden waren, war auf die Proliferation der Zellen zurückzuführen. Die Ratten, denen RINm5F-GK-Zellen implantiert worden waren, vermochten trotz der Glucoseresponsivität nur bis zu einem bestimmten Zeitpunkt die steigende Seruminsulinkonzentration, die durch die Zunahme der Zellmasse insulinproduzierender Zellen hervorgerufen wurde, zu kompensieren. Tiere, deren Blutglucosewerte für mehr als 24 h unter 2 mM lagen, wurden getötet und die Tumore zur weiteren Analyse explantiert.

Das durchschnittliche Gewicht der explantierten Tumore von RINm5F-Kontrollzellen lag bei 347 ± 39 mg ($n=5$), wohingegen der Mittelwert für Tumore von RINm5F-GK-Zellen nur bei 189 ± 21 mg ($n=6$) lag. Diese Ergebnisse befinden sich in guter Überein-

stimmung mit den Proliferationsraten, die diese RINm5F-Zellklone unter Gewebekulturbedingungen zeigen (Abb. 3.15).

Die Seruminsulinkonzentrationen der implantierten Ratten betragen für die RINm5F-Kontrollzellen $5,4 \pm 0,8$ ng/ml (n=5) und für RINm5F-GK-Zellen $3,8 \pm 0,8$ ng/ml (n=6).

Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde mit einer Laborwaage unter einer Reinraumwerkbank dreimal wöchentlich bestimmt.

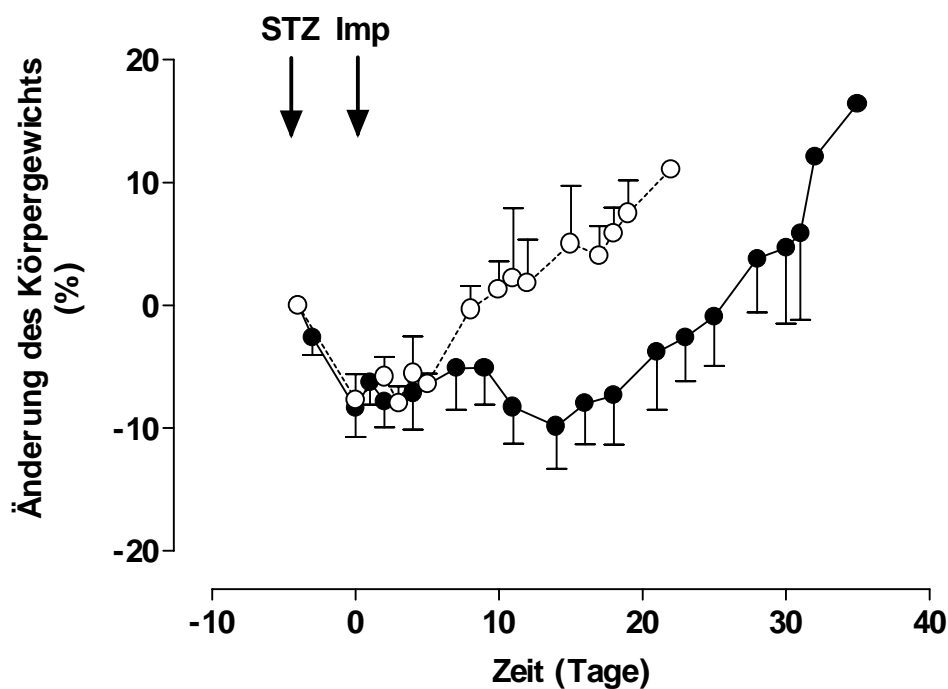


Abb. 3.12: Verlauf des Körpergewichts von diabetischen immundefizienten Ratten nach Implantation von RINm5F-GK-Surrogatzellen und RINm5F-Zellen

Bei den Ratten wurde durch Injektion von Streptozotocin (STZ) 4-6 Tage vor der Implantation (Imp) von RINm5F-GK-Surrogatzellen (●) und RINm5F-Zellen (○) ein Diabetes induziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils 5 und 6 Tieren.

Der Verlauf der Blutglucosekonzentrationen von Ratten, die mit Kontrollzellen und RINm5F-GK-Zellen implantiert wurden, spiegelt sich auch in den Änderungen des Körpergewichts wider (Abb. 3.12). Bei mit Kontrollzellen implantierten Ratten trat 5 Tage nach der Injektion der Zellen eine deutliche Gewichtszunahme zeitgleich zur drastischen Abnahme der Blutglucosekonzentrationen auf (Abb. 3.11). Auch der Ge-

wichtsanstieg von RINm5F-GK-implantierten Ratten nach dem 15. Tag verlief antiparallel zur Blutglucosekonzentration.

3.2.2 Proliferationscharakteristika von RINm5F-GK-Surrogatzellen und RINm5F-Zellen unter Gewebekulturbedingungen

Jeweils 10.000 RINm5F-Zellen bzw. RINm5F-GK-Zellen wurden je Kavität auf 96 *well dishes* ausgesät. Die relative Zellzahl wurde nach 0, 24, 48 und 72 h mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt.

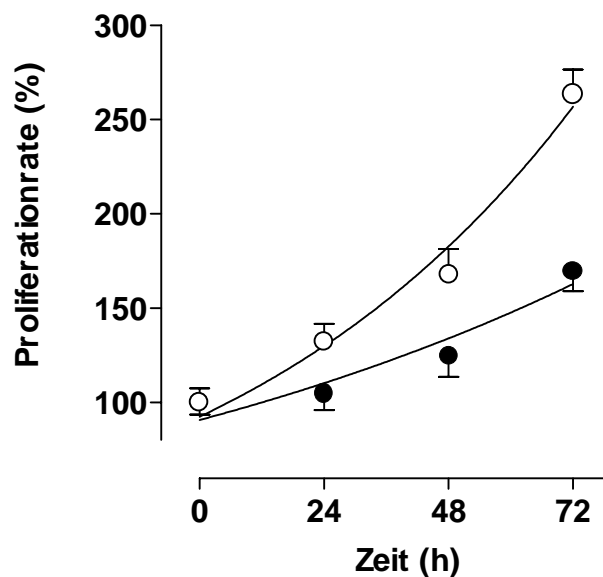


Abb. 3.13: Vergleich der Proliferationsrate von RINm5F-GK-Surrogatzellen mit RINm5F-Zellen

○ = RINm5F-Zellen, ● = RINm5F-GK-Zellen. Die Zellzahlen wurden mittels MTT-Tests quantifiziert. Die Zellzahlen zum Zeitpunkt 0 wurden auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 8 unabhängigen Experimenten.

Durch eine nicht-lineare Kurvenanpassung mit dem Computerprogramm GraphPad Prism 2.01 (Funktion: *Exponentiell growth*) ließ sich eine Verdoppelungszeit von 48 ± 5 h für RINm5F-Zellen und von 85 ± 8 h für RINm5F-GK-Zellen berechnen.

3.2.3 Orale Glucosebelastung diabetischer immundefizienter Ratten nach Implantation von RINm5F-GK-Surrogatzellen und RINm5F-Kontrollzellen

Um einen weiteren Beweis für die glucoseinduzierte Insulinsekretion von RINm5F-GK-Surrogatzellen *in vivo* zu liefern, wurden Glucosetoleranztests mit den implantierten

Ratten durchgeführt. Den Tieren wurde nach vierstündigem Fasten oral Glucoselösung (1 g/kg Körpergewicht; 1 g in 1 ml Wasser gelöst) mit einer Sonde verabreicht. Nach 0, 30, 60 und 120 min wurden von den Tieren Blutproben genommen, um die Blutglucose- und Seruminsulinkonzentrationen zu bestimmen.

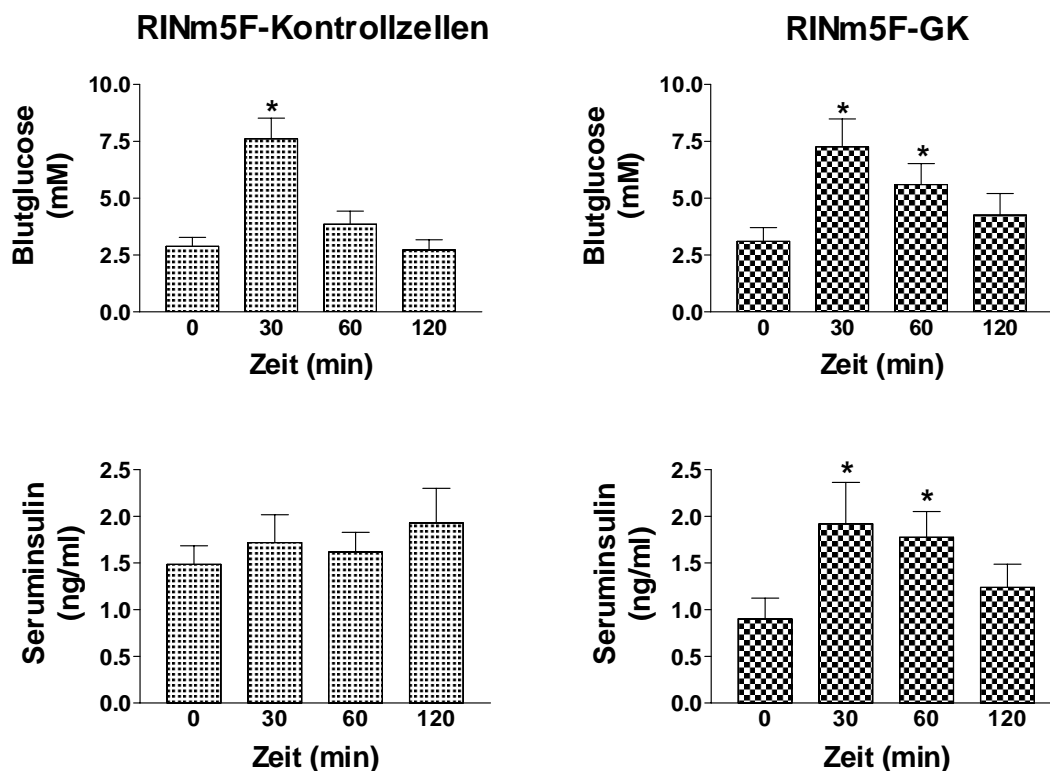


Abb. 3.14: Einfluß oraler Glucosegabe auf Blutglucose- und Seruminsulinkonzentrationen implantierter immundefizienter Ratten

Nach oraler Glucosegabe (1 g/kg Körpergewicht) wurden Blutglucose- und Seruminsulinkonzentrationen von immundefizienten Ratten, denen RINm5F-GK-Surrogatzellen und RINm5F-Kontrollzellen implantiert worden waren, über einen Zeitraum von 120 min gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils 6 und 4 Tieren. *Signifikanzniveau $p < 0,05$.

Die Glucosebelastung führte sowohl bei den mit Kontrollzellen als auch bei den mit RINm5F-GK implantierten Ratten zu einem ca. 300%igen Anstieg der Blutglucosekonzentration nach 30 min (Abb. 3.14). Bei den mit Kontrollzellen implantierten Ratten jedoch ging die Blutglucosekonzentration nach 60 min fast wieder auf den Wert nach dem Fasten herunter. Nach 120 min war der Blutglucosespiegel sogar etwas unter dem Ausgangswert bei 0 min. Die Seruminsulinkonzentrationen wurden durch den Anstieg

der Blutglucosekonzentrationen nicht signifikant geändert. Im Gegensatz dazu führte der Anstieg der Blutglucosewerte nach 30 und 60 min bei RINm5F-GK implantierten Ratten auch zu einem signifikanten Anstieg der Seruminsulinkonzentration um bis zu 200 %.

3.2.4 Stabilität der Glucokinase-, GLUT2-Glucosetransporter- und Insulin-Genexpression von RINm5F-GK-Zellen unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen



Abb. 3.15 Glucokinase-, GLUT2-Glucosetransporter- und Insulin-Genexpression in RINm5F-Kontrollzellen und RINm5F-GK-Zellen unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen

GK = Glucokinase mRNA, GLUT2 = mRNA des GLUT2-Glucosetransporters, INS = Insulin mRNA, K = RINm5F-Kontrollzellen, GK = RINm5F-GK-Zellen. Dargestellt ist die Genexpression von Glucokinase, GLUT2-Glucosetransporter und Insulin in RINm5F-Kontrollzellen und RINm5F-GK-Zellen unter Gewebekulturbedingungen (*in vitro*) und in explantiertem Gewebe (*in vivo*). Die Genexpression wurde durch *Northern-Blot*-Analyse charakterisiert. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

Um die Stabilität der Glucokinaseüberexpression und der konstitutiven Expression des GLUT2-Glucosetransporters und des Insulins in RINm5F-Kontrollzellen und RINm5F-GK-Zellen nach der Implantation beurteilen zu können, wurden *Northern-Blot*-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde RNA aus explantierten Tumoren von RINm5F-Kontrollzellen und RINm5F-GK-Zellen isoliert und mit spezifischen cRNA-Gensonden

für GK, GLUT2 und Insulin hybridisiert. Als Kontrolle diente mRNA, die aus Zellen isoliert wurde, die unter Gewebekulturbedingungen wachsen konnten. Durch die Bedingungen *in vivo* nach Implantation wurden weder die Glucokinaseüberexpression noch die Expression von GLUT2-Glucosetransporter und Insulin im Vergleich zu den *in vitro* Bedingungen der Gewebekultur beeinflusst.

3.3 Charakterisierung von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage

Neben den Transfektionsstudien an RINm5F-Zellen in der niedrigen 19. Passage wurden auch RINm5F-Zellen in der 89. Passage mit der cDNA der human B-Zellglucokinase und des Ratten-GLUT2-Glucosetransporters stabil transfiziert. Durch weitreichendere Entdifferenzierungsprozesse in RINm5F-Zellen der hohen im Vergleich zur niedrigen Passage konnte durch die Überexpression von Glucokinase nur eine glucoseinduzierte Insulinsekretion im unteren millimolaren Glucosekonzentrationsbereich erreicht werden (s. Abschnitt 3.3.5).

In den RINm5F-Zellen der hohen Passage war die Expression des GLUT2-Glucosetransporters im Gegensatz zu Zellen in der niedrigen Passage nicht zu detektieren. Dies macht die GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen in der hohen Passage zu einem idealen Modell zur Untersuchung der Toxizität von Alloxan und Streptozotocin. Diese beiden diabetogenen Substanzen sind in der experimentellen Diabetologie schon seit langem etabliert. Die Mechanismen ihrer toxischen Wirkung auf die B-Zellen des Pankreas sind aber noch weitgehend unklar. Nach Lenzen *et al.* (1988) ergeben sich Hinweise, daß die toxische Wirkung mit der Expression des GLUT2-Glucosetransporters assoziiert sein könnte. An RINm5F-GLUT2-Zellen und nicht transfizierten RINm5F-Kontrollzellen war es im Vergleich möglich, den Einfluß des GLUT2-Glucosetransporters auf die toxische Wirkung von Alloxan und Streptozotocin zu untersuchen.

Die Regulation der Glucokinase-Enzymaktivität in B-Zellen des Pankreas stellt das entscheidende Modulationsprinzip für Änderungen der Glucosephosphorylierung dar. Glucose wirkt dabei nicht nur stimulierend auf die Glucokinasegenexpression, sondern

auch über einen kurzfristigeren direkten Effekt auf die Enzymaktivität (Chen *et al.* 1994). Ein Protein, das durch Interaktion mit der Glucokinase ähnlich wie das Glucokinase-regulatorische Protein der Leber eine Modulation der Glucokinaseaktivität ermöglicht, konnte in der pankreatischen B-Zelle bislang aber nicht nachgewiesen werden. Das Methodenspektrum zur Untersuchung des Glucokinase-regulatorischen Proteins in der Leber umfaßte auch Permeabilisierungsversuche an isolierten Hepatozyten. Diese Versuche gingen von der Annahme aus, daß ein intrazellulär gebundenes Glucokinaseprotein nach Permeabilisierung der Plasmamembran mit der Substanz Digitonin nicht oder zumindest erschwert in den Extrazellulärraum diffundiert und dort durch Enzymtests und *Western-Blot*-Analysen nachgewiesen werden kann. Dieser Versuchsansatz läßt sich nur unter großen methodischen Schwierigkeiten von Hepatozyten auf pankreatische B-Zellen übertragen. Zum einen besitzen pankreatische B-Zellen nur 10 % der Glucokinaseaktivität der Leber, zum anderen lassen sich B-Zellen nur unter großem Aufwand und in kleinen Mengen aus Pankreata von Versuchstieren isolieren. Mit den Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen stand jedoch ein Modell der pankreatischen B-Zelle zur Verfügung, das es ermöglichte durch geringen Aufwand ausreichende Mengen biologischen Materials für die Permeabilisierungsversuche zu gewinnen, um so die Frage nach einer intrazellulären Bindung der Glucokinase und der Regulation der Enzymaktivität zu beantworten.

3.3.1 Nachweis der Genexpression von Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter in transfizierten RINm5F-Zellen hoher Passage

Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter wurden in RINm5F-Zellen der 89. Passage mit dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 unter Kontrolle des CMV Promotors überexprimiert. Positive, d.h. überexprimierende RINm5F-Zellklone wurden zunächst durch *Northern*- und *Western-Blot*-Analysen identifiziert. Anschließend wurden die Auswirkungen der Überexpression auf die Glucosephosphorylierung, -aufnahme, -oxidation und die glucoseinduzierte Insulinsekretion auf die transfizierten RINm5F-Zellen untersucht.

3.3.1.1 *Northern-Blot-Analyse von Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen*

Durch eine spezifische DIG-UTP markierten *Antisense*-cRNA-Gensonde war es möglich, Glucokinase-mRNA sensitiv nachzuweisen. In RINm5F-Zellen der hohen Passage (Abb. 3.16) war die Expression der Glucokinase wie auch bei RINm5F-Zellen der niedrigen Passage (Abb. 3.1) nicht detektierbar. Durch die Transfektion der RINm5F-Zellen mit dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3-GK konnte die Expression auf ein über der Leber liegendes Niveau gesteigert werden (Abb. 3.16). Das nachgewiesene Glucokinase-Transkript hatte eine Länge von 2,4 kb. Als *Mock*-Transfektanden dienten RINm5F-Zellklone die mit dem Vektor pcDNA3 ohne cDNA transfiziert wurden. Bei diesen Zellen war ebenfalls wie bei den nicht-transfizierten RINm5F-Zelle keine Glucokinasegenexpression nachweisbar (Abb. 3.16, K2). Zur Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Agarosegels wurden die 18S- und 28S-ribosomalen Banden herangezogen.

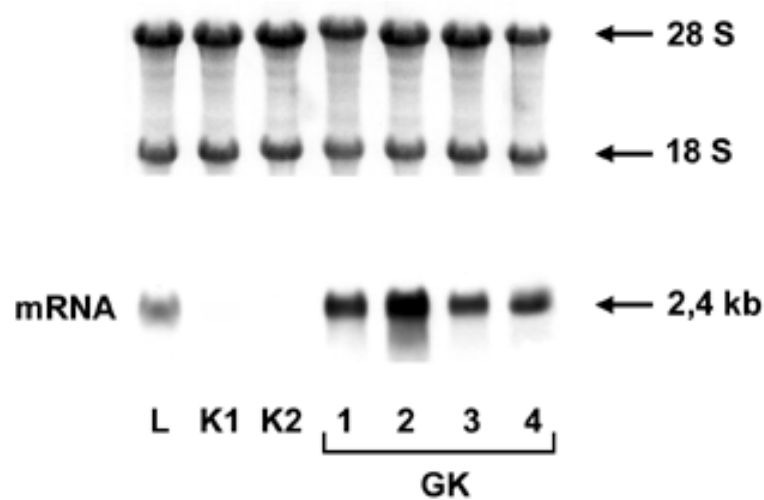


Abb. 3.16: Northern-Blot-Analyse der Glucokinase-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber

L = Leber, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = RINm5F-Zellen mit dem Vektor pcDNA3 stabil transfiziert, 1 - 4 = 4 unterschiedliche RINm5F-Zellklone nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pcDNA3-GK. Aufgetragen wurden 10 µg RNA/Bahn. Die RNA wurde mit einer für Glucokinase spezifischen cRNA-Gensonde unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die 28S- und 18S-ribosomalen Banden zeigen die gleichmäßige Beladung des Agarosegels. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

3.3.1.2 Western-Blot-Analyse von Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen

Nach der Überprüfung der Glucokinasegenexpression auf der transkriptionellen Ebene durch *Northern-Blot*-Analysen sollte Glucokinaseprotein in transfizierten RINm5F-GK-Zellen durch *Western-Blot*-Analysen nachgewiesen werden. Hierzu wurde das Protein von Zellhomogenaten in einer PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran gebettet.

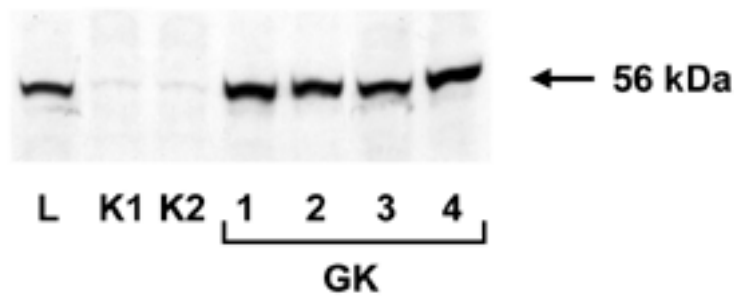


Abb. 3.17: Western-Blot-Analyse der Glucokinase-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber

L = Leber, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = RINm5F-Zellen mit dem Vektor pcDNA3 stabil transfiziert, 1 - 4 = 4 unterschiedliche RINm5F-Zellklone nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pcDNA3-GK. Aufgetragen wurden 10 µg Protein/Bahn. Das Protein aus Zellhomogenaten wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Glucokinase-Proteinexpression wurde mit einem spezifischen gegen Glucokinase gerichteten Antikörper detektiert. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot von 4 unabhängigen Experimenten.

Mit einem Glucokinase-spezifischen Antikörper (Tiedge & Lenzen 1995) war das Protein im Autoradiogramm als singuläre 56-kDa-Bande detektierbar (Abb. 3.17). Die Stärke der Glucokinaseüberexpression in RINm5F-GK-Zellen entsprach der Expression der Glucokinase in der Rattenleber. In nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen und *mock*-transfizierten RINm5F-Zellen war wie schon bei der *Northern-Blot*-Analyse keine Glucokinase-Expression nachweisbar.

3.3.1.3 *Northern-Blot*-Analyse von GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen

Wie schon bei den Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen so wurden auch bei der Überexpression des GLUT2-Glucosetransporters in RINm5F-Zellen positive Zellklone zunächst durch *Northern-Blot*-Analysen identifiziert. Mit einer GLUT2-Glucosetransporter-spezifischen Gensonde war das 2,8-kb-Transkript in RINm5F-GLUT2 detektierbar (Abb. 3.18). Das Expressionsniveau des GLUT2 in den überexprimierenden RINm5F-Zellen entsprach dem der Leber. Im Gegensatz zu nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen niedriger Passage (Abb. 3.3, K1) war in RINm5F-Kontrollzellen hoher Passage eine Expression des GLUT2-Glucosetransporters nicht nachweisbar (Abb. 3.18, K1). Auch für *Mock*-Transfektanden fiel der Nachweis von GLUT2-mRNA im *Northern Blot* negativ aus.

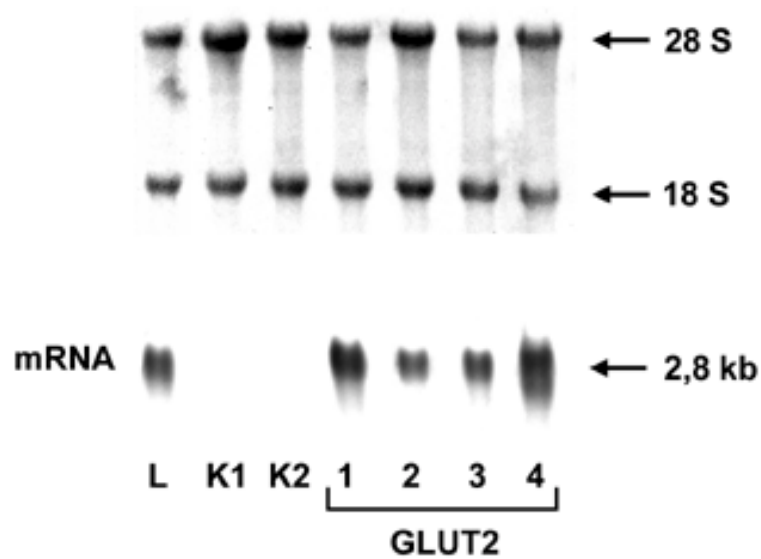


Abb. 3.18: Northern-Blot-Analyse der GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber

L = Leber, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = RINm5F-Zellen mit dem Vektor pcDNA3 stabil transfiziert, 1 - 4 = 4 unterschiedliche RINm5F-Zellklone nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pcDNA3-GK. Aufgetragen wurden 10 µg RNA/Bahn. Die RNA wurde mit einer für GLUT2 spezifischen cRNA-Gensonde unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die 28S- und 18S-ribosomalen Banden zeigen die gleichmäßige Beladung des Agarosegels. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot von 3 unabhängigen Experimenten.

3.3.1.4 Western-Blot-Analyse von GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen

Auch in der *Western-Blot*-Analyse konnte wie im *Northern Blot* keine Expression des GLUT2-Glucosetransporters in nicht-transfizierten und *mock*-transfizierten RINm5F-Zellen hoher Passage nachgewiesen werden (Abb. 3.18). Die Analyse von Mikrosomenpräparationen im *Western Blot* ergab für GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen ein im Vergleich zur Leber ähnliches Expressionsniveau des GLUT2-Glucosetransporters. Wie bereits in Abschnitt 3.1.1.4 beschrieben sind die im Autoradiogramm des *Western Blot* sichtbaren Doppelbanden nicht auf eine mangelnde Selektivität des verwendeten Antikörper zurückzuführen sondern vermutlich auf Unterschiede in der Glycosidierung oder Phosphorylierung oder in der Proteolyse des GLUT2-Proteins.



Abb. 3.19: Western-Blot-Analyse der GLUT2-Überexpression in RINm5F-Zellen im Vergleich zur Leber

L = Leber, K1 = nicht transfizierte RINm5F-Zellen, K2 = RINm5F-Zellen mit dem Vektor pcDNA3 stabil transfiziert, 1 - 4 = 4 unterschiedliche RINm5F-Zellklone nach stabiler Transfektion mit dem Vektor pcDNA3-GLUT2. Aufgetragen wurden 10 μ g Protein/Bahn. Das Protein aus Mikrosomenpräparationen wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die GLUT2-Proteinexpression wurde mit einem spezifischen gegen GLUT2 gerichteten Antikörper detektiert. Abgebildet ist ein repräsentativer Blot von 4 unabhängigen Experimenten.

3.3.2 Glucosephosphorylierung von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage

Durch die spektralphotometrische Messung der Glucosephosphorylierungsaktivitäten von Zellhomogenaten transfizierter RINm5F-Zellen konnte bestätigt werden, daß ein funktionsfähiges Glucokinase-Enzymprotein in RINm5F-GK-Zellen überexprimiert wurde. Durch 1 mM und 100 mM Glucosekonzentration war es möglich, im enzymgekoppelten Assay zwischen den Glucosephosphorylierungsaktivitäten der Hexokinase und Glucokinase mit ihren unterschiedlichen K_m -Werten für das Substrat Glucose zu unterscheiden (s. Abschnitt 3.1.2).

Zelltyp	Glucokinase (U/g DNA)	Hexokinase (U/g DNA)	Anteil der Glucokinase an der Phosphorylierungsaktivität (%)
RINm5F (Kontrolle)	12 ± 3	185 ± 13	6
RINm5F-GK	190 ± 17*	145 ± 17	56
RINm5F-GLUT2	17 ± 5	216 ± 23*	7

Tab. 3.4: Effekt der Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression auf die Aktivitäten glucosephosphorylierender Enzyme in RINm5F-Zellen

Die Enzymaktivitäten von Zellhomogenaten wurden photometrisch mit einem enzymgekoppelten Assay bei 37 °C gemessen. Die Mittelwerte ± SEM von 6 unabhängigen Experimenten sind in U/g DNA angegeben. * Signifikantsniveau $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle.

Die für die RINm5F-Zellen in der hohen Passage gemessenen Phosphorylierungsaktivitäten von Glucokinase und Hexokinase sind in guter Übereinstimmung mit den Daten der RINm5F-Zellen niedriger Passage (Abschnitt 3.1.2). Auch bei den nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen hoher Passage sind mit 185 U/gDNA relativ hohe Hexokinasephosphorylierungsaktivitäten zu messen. Dies führt zu einem relativen Glucokinase-mangel der sich in einem Anteil von nur 6 % der Glucokinase an der gesamten Phosphorylierungsaktivität der Zellen ausdrückt. Durch die Überexpression der Glucokinase in RINm5F-Zellen gelang es den für die glucoseinduzierte Insulinsekretion wichtigen Anteil der Glucokinase an der Gesamtphosphorylierungsaktivität von 6 % auf 56 % zu steigern. Die Glucokinasephosphorylierungsaktivität wurden dabei in RINm5F-GK-Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen um den Faktor 16 auf 190 U/gDNA gesteigert. Trotz signifikant erhöhter Hexokinaseaktivitäten in GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen veränderte sich der Anteil der Glucokinase an der Phosphorylierungsaktivität mit 7 % nur unwesentlich im Vergleich zu nicht-transfizierten RINm5F-Zellen.

3.3.3 Glucoseoxidation von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage

Die Auswirkungen einer Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression in RINm5F-Zellen wurden durch Inkubationen mit unterschiedlichen D-[U-¹⁴C]-Glucosekonzentrationen untersucht. Über die Menge des dabei gebildeten ¹⁴CO₂ war es dabei möglich zu bestimmen, ob millimolare Glucosekonzentrationen an den oxidativen Metabolismus der RINm5F-Zellen gekoppelt werden.

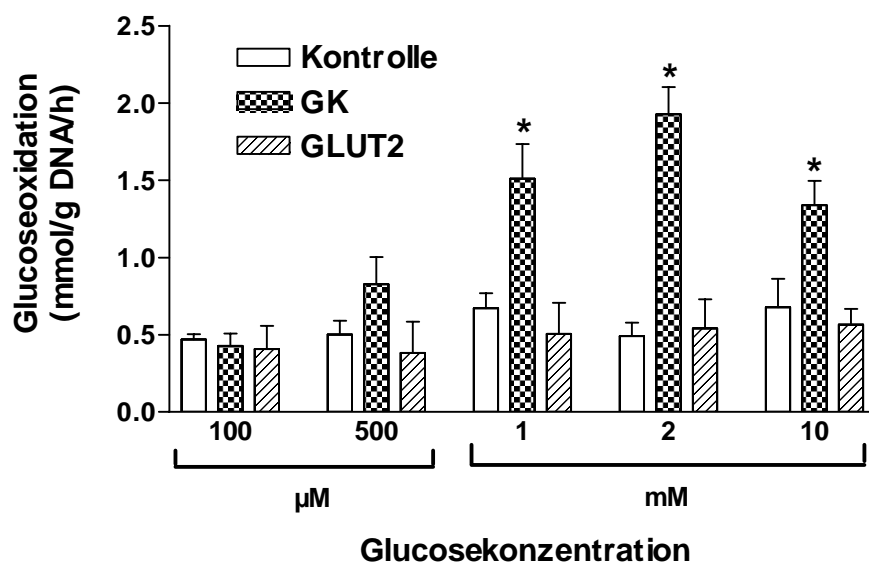


Abb. 3.20: Effekt der Überexpression von Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter auf die Glucoseoxidation in RINm5F-Zellen

Kontrolle = RINm5F-Zellen, GK = RINm5F-GK-Zellen, GLUT2 = RINm5F-GLUT2-Zellen. Die Zellen wurden für 60 min bei 37 °C mit unterschiedlichen D-[U-¹⁴C]-Glucosekonzentrationen inkubiert. Die Mengen des gebildeten ¹⁴CO₂ wurden im β -Szintillationszähler gemessen und dienen zur Berechnung der Glucoseoxidationsraten. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4-6 Experimenten. *Signifikanzniveau $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle.

Für nicht-transfizierte RINm5F-Kontrollzellen und RINm5F-GK-Zellen ergaben sich dabei im gewählten Glucosekonzentrationsbereich von 100 μ M bis 10 mM keine signifikanten Änderungen in der gebildeten ¹⁴CO₂-Menge (Abb. 3.20). Nur Glucokinase-überexprimierende RINm5F-Zellen konnten millimolare Glucosekonzentrationen an den oxidativen Metabolismus koppeln. Zwischen 1 mM und 10 mM Glucose war die Glucoseoxidation mit bis zu 1,9 mmol/gDNA/h ca. viermal höher als in nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen oder RINm5F-GLUT2-Zellen. Das Maximum wurde

bei einer Konzentration von 2 mM Glucose erreicht. Bei einer Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM nahm die Glucoseoxidation in RINm5F-GK-Zellen aufgrund der Hemmung der Hexokinaseaktivität durch das gebildete Glucose-6-phosphat um 30 % ab. Die Abhängigkeit der Glucoseoxidation von der Glucosekonzentration war in RINm5F-Zellen der hohen Passage mit der von RINm5F-Zellen der niedrigen Passage vergleichbar (Abb. 3.5, Abb. 3.20).

3.3.4 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage

Die Glucosetransportaktivitäten von RINm5F-Zellen wurden durch Aufnahmekinetiken mit 10 mM 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose (10 µCi/ml) quantifiziert. Die von den Zellen nach 10 bis 120 s Expositionszeit akkumulierte 3-O-Methyl[1-³H]-Glucosemenge konnte mit einem β-Szintillationszähler gemessen werden. Anhand der ermittelten kinetischen Daten konnten die initiale Geschwindigkeit der 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme und die Zeit bis zur halbmaximalen Gleichgewichtseinstellung berechnet werden.

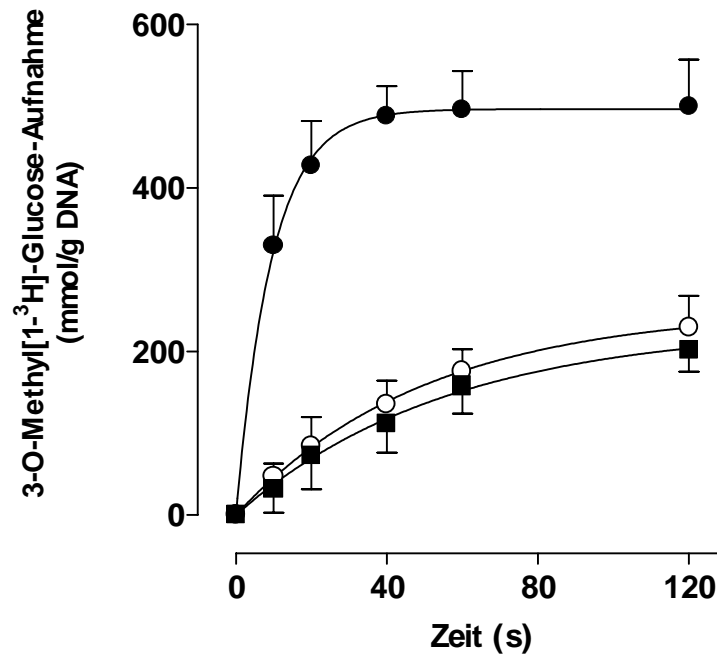


Abb. 3.21: Effekt der Überexpression von Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter auf die 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme von RINm5F-Zellen

● = RINm5F-GK-Zellen, ○ = RINm5F-Zellen, ■ = RINm5F-GK-Zellen. Die Zellen wurden bei 37 °C mit 10 mM 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose (10 μCi/ml) in KR-Puffer für 10-120 s inkubiert. Die von den Zellen aufgenommene 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose wurde im β-Szintillationszähler quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 4 Experimenten.

Durch die Überexpression des GLUT2-Glucosetransporters in RINm5F-Zellen konnte die Zeit bis zur halbmaximalen Gleichgewichtseinstellung der 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme von 34,7 s in nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen auf 6,6 s in RINm5F-GK-Zellen verkürzt werden (Tab. 3.5, Abb. 3.21). Dieser Effekt geht einher mit einer 9fach höheren initialen Geschwindigkeit der 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme in RINm5F-GLUT2-Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen. Die Überexpression von Glucokinase in RINm5F-Zellen hingegen hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Zeit bis zur halbmaximalen Gleichgewichtseinstellung und die initiale Geschwindigkeit der 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme.

3-O-Methyl[1- ³ H]-Glucose-Aufnahme		
Zelltyp	Initiale Geschwindigkeit (mol/g DNA/min)	Zeit bis zur halbmaximalen Gleichgewichtseinstellung (s)
RINm5F (Kontrolle)	0,27 ± 0,2	34,7 ± 1,0
RINm5F-GK	0,23 ± 0,6	38,8 ± 4,4
RINm5F-GLUT2	1,94 ± 1,1*	6,6 ± 0,2*

Tab. 3.5: Effekte der Glucokinase und GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression auf die Charakteristika der 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme

Die initialen Geschwindigkeiten wurden aus den linearen Aufnahmephasen zwischen 0 und 10 s bei 10 mM 3-O-Methyl[1-³H]-Glucoseaufnahme berechnet. Die Zeit bis zur halbmaximalen Gleichgewichtseinstellung wurde mit der nicht-linearen Regressionsanalyse *one phase exponentiell association* aus den 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahmekinetiken in Abb. 3.21 berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 4 unabhängigen Experimenten. *Signifikantsniveau $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle.

3.3.5 Glucoseinduzierte Insulinsekretion und Insulingehalt von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage

Die glucoseinduzierte Insulinsekretion von Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen in der hohen Passage, die in statischen Glucoseinkubationen bestimmt wurden, zeigte nur bei 1 mM Glucose einen signifikanten 1,4 fachen Anstieg im Vergleich zur Basalsekretion (Abb. 3.9). Bei höheren Glucosekonzentrationen nahm die Insulinsekretion wieder ab. Die GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen zeigten, wie die nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen keine Glucoseresponsivität der Insulinsekretion bei mikro- und millimolaren Glucosekonzentrationen.

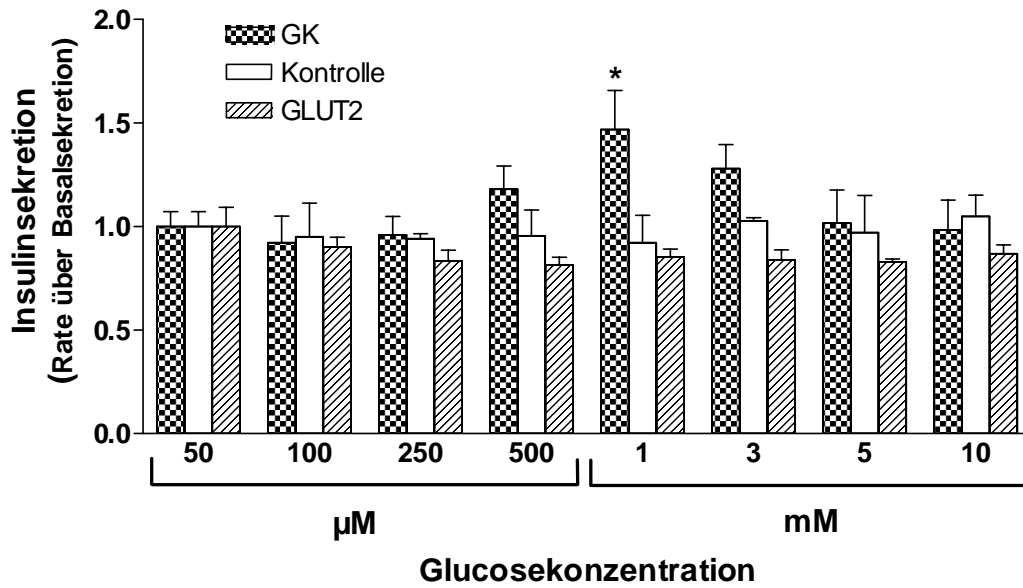


Abb. 3.22: Glucoseinduzierte Insulinsekretion von Glucokinase- und GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen

Kontrolle = RINm5F-Zellen, GK = RINm5F-GK-Zellen, GLUT2 = RINm5F-GLUT2-Zellen. Die Zellen wurden für 20 min bei 37 °C statisch mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen in KR-Puffer inkubiert. Die Menge des in den Überstand sezernierten Insulins wurde mittels Radioimmunoassays bestimmt und ist als Rate über der Basalsekretion angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 6 unterschiedlichen Experimenten. * Signifikantsniveau $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle.

Die basale Insulinsekretion war sowohl bei den RINm5F-GK- als auch bei RINm5F-GLUT2-Zellen um ca. die Hälfte erniedrigt (Tab. 3.6). Auf den Insulingehalt hatte die Transfektion der RINm5F-Zellen keinen signifikanten Einfluß.

Zelltyp	Basale Insulinsekretion (pg/ μ g DNA/h)	Insulingehalt (ng/ μ g DNA)	Basale Insulinsekretion (% des Insulingehalts)
RINm5F (Kontrolle)	243 \pm 21 (10)	1,7 \pm 0,2 (10)	14
RINm5F-GK	117 \pm 12 (10)*	1,5 \pm 0,2 (10)	8
RINm5F-GLUT2	123 \pm 7 (8)*	1,5 \pm 0,1 (8)	8

Tab. 3.6: Effekt der Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression auf die basale Insulinsekretion und den Insulingehalt von RINm5F-Zellen

Die Zellen wurden für 20 min in KR-Puffer mit 50 μ M Glucose inkubiert. Die Menge des in den Überstand sezernierten Insulins wurde mittels Radioimmunoassays gemessen. Der Insulingehalt der Zellen wurde nach Extraktion mit saurem Ethanol im Radioimmunoassay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. *Signifikantsniveau $p < 0,05$ verglichen mit der Kontrolle.

Aufgrund der fehlenden physiologischen Glucoseresponsivität von RINm5F-GK-Zellen hoher Passage schien eine Implantation in diabetische immundefiziente Ratten, wie sie für die physiologisch glucoseresponsiven RINm5F-GK-Zellen niedriger Passage durchgeführt wurde (Abschnitt 3.2), als nicht erfolgsversprechend. Durch Überexpression der Glucokinase in RINm5F-Zellen hoher Passage und aufgrund ihrer günstigen Wachstumskinetik konnten diese Zellen aber als Modell eingesetzt werden, um die intrazelluläre Bindung der Glucokinase und die Regulation der Glucokinase-Enzymaktivität durch Permeabilisierungsversuche zu untersuchen.

3.4 Untersuchungen zur Regulation der Glucokinase-Enzymaktivität in Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage

3.4.1 Glucokinase- und Hexokinaseaktivitäten nach Freisetzung aus RINm5F-GK Zellen durch Digitonin

Ziel dieser Versuche war die Charakterisierung der Regulation der Enzymaktivität durch intrazelluläre Bindung von Glucokinase und Hexokinase in insulinproduzierenden RINm5F-GK Zellen. Hierzu wurden die Zellen mit Digitonin permeabilisiert, einem

Gemisch von Steroidsaponinen, das als nichtionisches Detergenz wirkt und selektiv das cytoplasmatische Kompartiment von Zellen eröffnet. Zelluläre Strukturen wie Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum werden dabei nicht beeinflusst. Digitonin bewirkte eine konzentrationsabhängige Freisetzung der Glucokinaseaktivität in das extrazelluläre Medium, die bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ mit nahezu 100 % maximal war (Abb. 3.23).

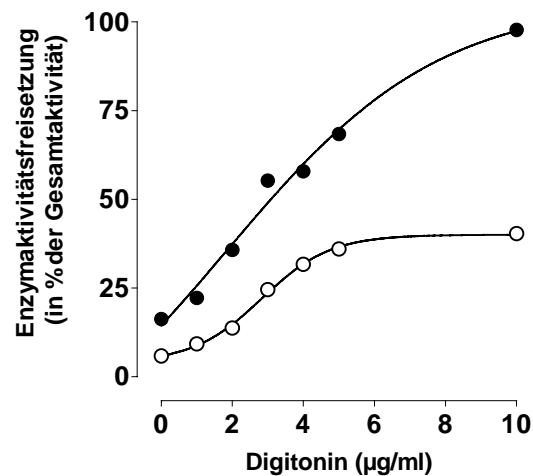


Abb. 3.23: Freisetzung von Glucokinase- und Hexokinaseenzymaktivitäten aus glucokinaseüberexprimierenden RINm5F-GK Zellen in Abhängigkeit von der Digitoninkonzentration

● = Glucokinase, ○ = Hexokinase. RINm5F-GK Zellen wurden in RPMI-1640 Medium bei 10 mM Glucose inkubiert. Die Zellen wurden in Assaypuffer mit verschiedenen Digitoninkonzentrationen für 5 min permeabilisiert. Anschließend wurden die Glucokinase- und Hexokinase-Enzymaktivitäten spektralphotometrisch bestimmt. Danach wurden durch 0,5 % Triton X-100 die zellulär gebundenen Enzyme herausgelöst und ebenfalls spektralphotometrisch quantifiziert. Die Glucosephosphorylierungsaktivitäten sind in % der Gesamtaktivität des jeweiligen Enzyms angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten.

Der durch nicht lineare Regressionsanalyse ermittelte EC_{50} -Wert der Glucokinaseaktivitäts-Diffusion betrug 3,08 $\mu\text{g/ml}$. Die Diffusionsrate der Hexokinase war im Vergleich zur Glucokinase deutlich geringer und erreichte ab 5 $\mu\text{g/ml}$ Digitonin einen Maximalwert von 40 % der zellulären Gesamtaktivität (Abb. 3.23). Der EC_{50} -Wert der Hexokinaseaktivitätsfreisetzung betrug 2,8 mg/ml . Die im Vergleich zur Glucokinase geringe Freisetzung von Hexokinaseaktivität ist mit der intrazellulären Bindung des Enzyms an Mitochondrien zu erklären.

3.4.2 Glucokinaseaktivität in Abhängigkeit von der Proteinfreisetzung aus RINm5F-GK-Zellen unter dem Einfluß steigender Digitoninkonzentration

Anhand dieser Versuche sollte der Aktivitätszustand der diffusiblen Glucokinasefraktion in bezug auf die Menge des freigesetzten Enzymproteins charakterisiert werden. Hierzu wurden die durch Digitoninpermeabilisierung freigesetzten zellulären Proteine durch Acetonfällung aufkonzentriert und die Glucokinaseproteinmenge durch *Western-Blot*-Analyse mit einem spezifischen Antikörper quantifiziert. Das zellulär gebundene Glucokinaseprotein wurde in einem weiteren Schritt durch eine 0,5%ige Triton X-100-Lyse herausgelöst und ebenfalls durch *Western Blotting* analysiert.

In Abhängigkeit von der Digitoninkonzentration nahm die Menge des Glucokinaseproteins im extrazellulären Medium zu, wohingegen die verbliebene, aus dem Lysat mobilisierbare, Menge des Glucokinaseproteins entsprechend abnahm (Abb. 3.24).

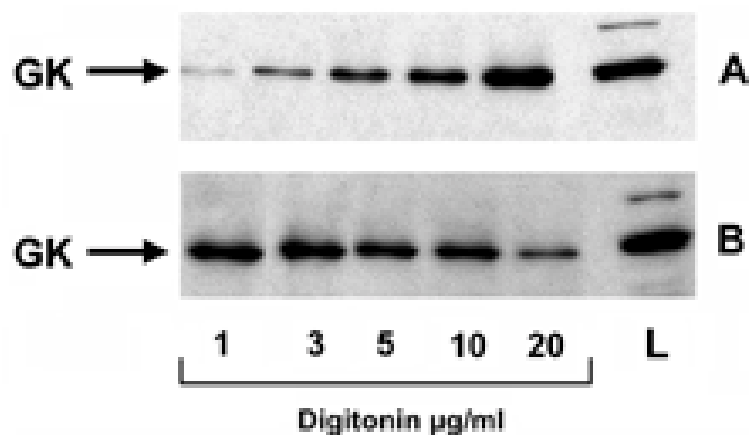


Abb. 3.24: Freisetzung von Glucokinaseprotein aus RINm5F-GK-Zellen in Abhängigkeit von der Digitoninkonzentration

A = Proteine aus extrazellulärem Überstand, B = Proteine aus intrazellulärem Lysat, L = 5 µg cytosolisches Extrakt aus der Rattenleber. RINm5F-GK Zellen wurden in RPMI-1640 Medium bei 10 mM Glucose inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in RPMI-1640 Medium mit verschiedenen Digitoninkonzentrationen permeabilisiert. Die in den Extrazellulärraum diffundierten Proteine wurden durch zweimalige Acetonfällung präzipitiert. Die intrazellulären Proteine wurden nach Lyse mit 0,5 % Triton X-100 ebenfalls präzipitiert. Das Glucokinaseprotein wurde durch *Western-Blot*-Analyse unter Verwendung eines glucokinasespezifischen Antikörpers quantifiziert.

Im Vergleich zwischen der freigesetzten Glucokinase-Enzymaktivität und dem Glucokinase-Enzymprotein zeigte sich, daß bei einer Digitoninkonzentration von 10 µg/ml nahezu 100 % der zellulären Glucokinaseaktivität im extrazellulären Medium nachge-

wiesen werden konnten, aber nur 50 % des zellulären Glucokinaseproteins freigesetzt wurden (Abb. 3.23, Abb. 3.24).

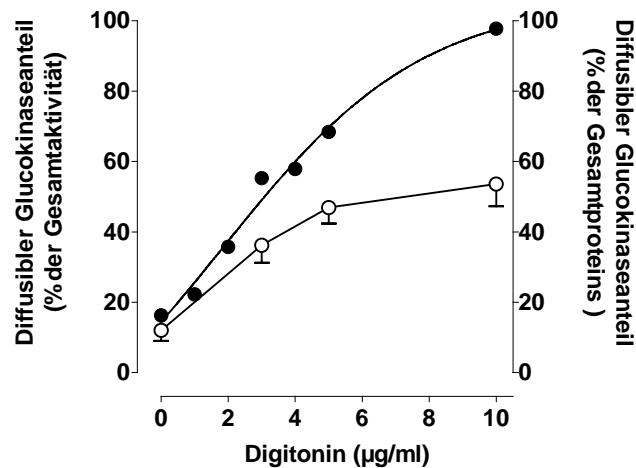


Abb. 3.25: Freisetzung der Glucokinase-Enzymaktivität und des Glucokinaseproteins aus glucokinaseüberexprimierenden RINm5F-GK Zellen in Abhängigkeit von der Digitoninkonzentration

● = Glucokinase-Enzymaktivität, ○ = Glucokinaseprotein. Die Glucokinase-Enzymaktivitäten wurden spektralphotometrisch, die Glucokinaseproteinkonzentrationen durch *Western-Blot*-Analysen bestimmt. Die Werte sind in % der Gesamtaktivität, bzw. des Gesamtproteins angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten.

3.4.3 Regulation der intrazellulären Glucokinaseaktivität in insulinproduzierenden RINm5F-GK-Zellen

In Anlehnung an die Versuche zur Glucokinaseaktivitäts- und proteinfreisetzung aus digitoninpermeabilisierten RINm5F-GK Zellen zielten diese Versuche auf die Frage nach einer eventuellen Existenz eines regulatorischen Proteins in den transfizierten Zellen ab. Hierzu wurde die spezifische Glucokinaseaktivität, der Quotient aus Enzymaktivität und Proteinkonzentration, der diffusiblen und der gebundenen Glucokinase bestimmt. In Abhängigkeit von der Digitoninkonzentration blieb die spezifische Aktivität der diffusiblen Glucokinasefraktion nahezu konstant, wohingegen die der gebundenen Fraktion auf einen Werte nahe null deutlich abnahm (Abb. 3.26).

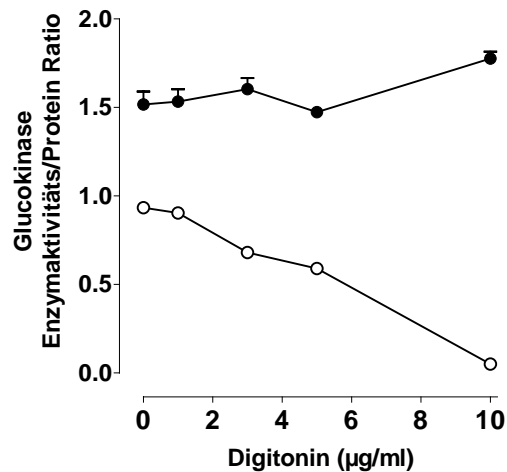


Abb. 3.26: Spezifische Aktivitäten der diffusiblen und der zellgebundenen Glucokinase in Abhängigkeit von der Digitoninkonzentration

● = Spezifische Aktivität der diffusiblen Glucokinase, ○ = Spezifische Aktivität der zellgebundenen Glucokinase. Von mit Digitonin permeabilisierten RINm5F-GK Zellen wurden die Aktivitäten und der Proteingehalt der diffusiblen und der gebundenen Glucokinase bestimmt. Die spezifische Glucokinaseaktivität wurde aus dem Quotienten von Enzymaktivität zu Proteingehalt bestimmt. Die Freisetzung der gebundenen Glucokinase erfolgte durch Lyse mit Triton X-100. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten.

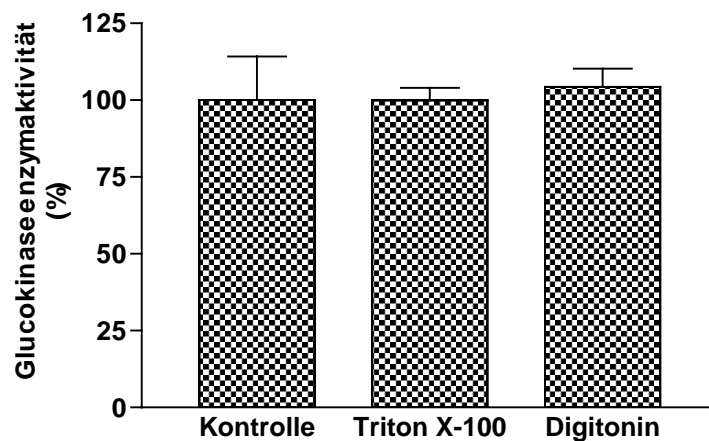


Abb. 3.27: Effekte von 10 µg/ml Digitonin bzw. 0,5 % Triton X-100 auf die Enzymaktivität rekombinanter Glucokinase

In einem spektralphotometrischen Assay wurden die Enzymaktivitäten rekombinanter humaner B-Zellglucokinase (Kontrolle), rekombinanter Glucokinase unter Zugabe von Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,5 % bzw. unter Zugabe von Digitonin (10 µg/ml) bestimmt. Die Daten sind in % der rekombinanten Glucokinaseaktivität ohne Zugabe von Triton X-100 oder Digitonin ausgedrückt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten.

Eine Modulation der spezifischen Aktivität zeigte sich nur bei der durch Triton X-100 extrahierten Glucokinasefraktion. Um einen direkten Triton X-100 Effekt auf die Glucokinase auszuschließen, wurde die Aktivität von rekombinanter B-Zellglucokinase in Gegenwart von 10 µg/ml Digitonin bzw. 0,5 % Triton X-100 bestimmt. Keine der Substanzen zeigte einen Effekt auf die Aktivität der rekombinanten Glucokinase (Abb. 3.27).

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der durch Triton X-100 hervorgerufene, hemmende Effekt auf die spezifische Aktivität der gebundenen Glucokinasefraktion in Zusammenhang mit einem speziellen intrazellulären Faktor steht. Zur Verifizierung wurde der Effekt von 0,5 % Triton X-100 auf die Glucokinaseaktivität von RINm5F-GK Zellen, die mit Hilfe von Ultraschall homogenisiert wurden, verglichen mit dem Effekt auf Eluate, die durch Digitoninpermeabilisierung gewonnen wurden (Abb. 3.28).

In Gegenwart von 0,5 % Triton X-100 fiel die Glucokinaseaktivität des Ultraschallhomogenates auf 52 % des Vergleichswertes ab, indessen nahm die Hexokinaseaktivität um 33 % zu (Abb. 3.28). Letzteres ist möglicherweise auf die Freisetzung von ursprünglich mitochondrial gebundenen Enzymen zurückzuführen. Ähnliche Verhältnisse zeigten sich bei der direkten Lyse der RINm5F-GK Zellen mit 0,5 % Triton X-100 (Abb. 3.28). Die Gabe von 0,5 % Triton X-100 zu den durch Digitoninpermeabilisierung gewonnenen Eluaten bewirkte eine signifikante Abnahme der Glucokinaseaktivität auf 55 %, wohingegen die Hexokinaseaktivität nahezu unbeeinflusst blieb. Demnach ist anzunehmen, daß Triton X-100 entweder einen Inhibitor der Glucokinase aktiviert oder einen Stimulator inaktiviert.

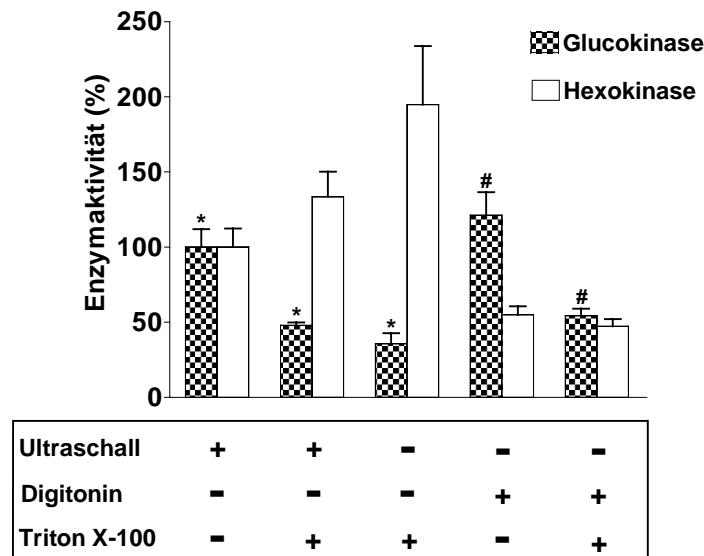


Abb. 3.28: Effekt von Ultraschallhomogenisation, Digitonin und Triton X-100 auf die Glucokinase- und Hexokinase-Aktivitätsfreisetzung aus RINm5F-GK-Zellen

Je Versuchsansatz wurden 4×10^5 RINm5F-GK Zellen in einer 6-cm-Gewebekulturschale mit RPMI-1640 Medium bei 1 mM Glucose inkubiert. Die Zellen wurden entweder durch Ultraschall homogenisiert, gefolgt von einer Pelletierung von Zellbruchstücken durch eine zehnmütige Zentrifugation bei 10.000 g (4 °C), oder durch 10 µg/ml Digitonin permeabilisiert oder mit 0,5 % Triton X-100 lysiert. In Experimenten mit einem kombinierten Ultraschallaufschluß und einer Triton X-100 Extraktion wurde das Detergenz nach Pelletierung der Zellbruchstücke hinzugegeben. In Experimenten mit einer kombinierten Digitonin und Triton X-100 Behandlung wurden die Zellen zuerst mit Digitonin permeabilisiert. Anschließend wurde das Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,5 % zum Eluat hinzugefügt. Die Enzymaktivitäten wurden in einem spektralphotometrischen Assay gemessen. Die Daten sind in % der Enzymaktivität nach Ultraschallaufschluß als Mittelwerte \pm SEM (n = 8-14). * p < 0,05 verglichen mit der Glucokinaseaktivität im reinen Ultraschallhomogenat (100 %). # p < 0,05 verglichen mit der Glucokinaseaktivität im Digitonineluat.

3.4.4 Regulation der Glucokinase in insulinproduzierenden RINm5F-GK-Zellen durch einen spezifischen Proteinfaktor

Es war das Ziel der folgenden Experimente, eine Interaktion der Glucokinase mit zellulären Proteinen in insulinproduzierenden Zellen zu charakterisieren. Hierzu wurde die Aktivität eines rekombinanten Glucokinaseproteins in Digitonineluaten von RINm5F-GK-Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Inaktivierung der zellulären Proteine untersucht. Dieses Glucokinaseprotein war zuvor aus *E.coli*-Bakterien durch Metallchelatchromatographie aufgereinigt worden (Tiedge *et al.* 1997). Die Inaktivierung der zellulären Proteine erfolgte zum einen durch Hitzebehandlung (5 min, 95 °C) sowie

proteinspezifisch durch Inkubation mit Proteinase K (5 min, 25 °C). Das proteolytische, immobilisierte Enzym wurde anschließend durch Zentrifugation der Sepharose-Beads aus den zellulären Extrakten entfernt.

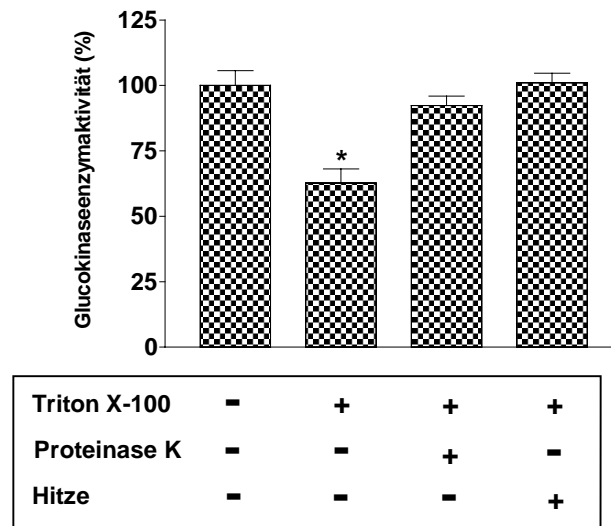


Abb. 3.29: Effekte einer Proteinase K- oder Hitzeinaktivierung zellulärer Proteine auf die Triton X-100 induzierte Hemmung der rekombinanten Glucokinase in Digitonineluaten von RINm5F-GK Zellen

Je Versuchsansatz wurden 4×10^5 RINm5F-GK Zellen in einer 6-cm-Gewebekulturschale mit RPMI-1640 Medium bei 1 mM Glucose inkubiert. Die Zellen wurden mit Digitonin (10 µg/ml in GK-Assaypuffer) permeabilisiert. Anschließend wurden die zellulären Proteine mit Proteinase K (5 min, 25 °C) oder durch Hitze (5 min, 95 °C) inaktiviert. Anschließend wurde Triton X-100 zu einer Endkonzentration von 0,5 % hinzugegeben, gefolgt von einer Zugabe von 20 mU rekombinanter humanen B-Zellglucokinase. Die Glucokinaseaktivitäten wurden in einem spektralphotometrischen Assay gemessen. Die Daten sind in % der rekombinanten Glucokinaseaktivität in Digitonineluaten ohne Zugabe von Triton X-100 ausgedrückt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (n = 6-12). * p < 0,05 verglichen mit Glucokinaseaktivitäten in Digitonineluaten.

Die Aktivität der rekombinanten Glucokinase nahm signifikant nach Zugabe zu einem zellulären Extrakt von RINm5F-GK Zellen, die mit 0,5 % Triton X-100 behandelt worden waren, um 40 % gegenüber den nicht behandelten Kontroll-Zellextrakten ab (Abb. 3.29). Wurden die zellulären Proteine der RINm5F-GK Extrakte zuvor durch Hitzebehandlung oder Proteinase K denaturiert, konnte die Enzymaktivität der rekombinanten Glucokinase nicht durch Triton X-100 gehemmt werden. Somit konnte gezeigt werden, daß die Glucokinase durch einen Proteinfaktor in insulinproduzierenden Zellen beeinflusst wird. Es soll an dieser Stelle nochmals betont werden, daß Triton X-100 in der verwendeten Endkonzentration von 0,5 % die Aktivität der rekombinanten Glucoki-

nase nicht beeinflusste (Abb. 3.27). Dies schließt einen unspezifischen Effekt des Triton X-100 auf die Konformation des Enzyms aus.

3.5 Effekt einer GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression auf die Zytotoxizität der diabetogenen Noxen Alloxan und Streptozotocin bei RINm5F-Zellen hoher Passage

Durch die Überexpression des GLUT2-Glucosetransporters in RINm5F-Zellen hoher Passage, in denen eine konstitutive GLUT2-Expression durch *Northern-* und *Western-Blot*-Analysen nicht nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.3.1.3 u. 3.3.1.4), steht ein ideales Modell zur Untersuchung der Bedeutung des GLUT2-Glucosetransporters für die Toxizität der diabetogenen Substanzen Alloxan und Streptozotocin zur Verfügung. Die Auswirkungen einer GLUT2-Glucosetransporterexpression für die Toxizität dieser beiden selektiven B-Zelltoxine sind durch Exposition von RINm5F-GLUT2 und nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen gegenüber Alloxan und Streptozotocin direkt erkennbar. Die Befunde wurden durch vergleichende Experimente an einem zweiten GLUT2-überexprimierenden Zellklon bestätigt.

3.5.1 Schädigung von RINm5F-GLUT2-Zellen durch Alloxan und Streptozotocin

RINm5F-GLUT2- und nicht-transfizierte RINm5F-Kontrollzellen wurden mit Alloxan-konzentrationen im Bereich von 0 mM bis 20 mM für 1 h inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde nach dem Wechsel des Kulturmediums nach 16 h im MTT-Zytotoxizitätstest bestimmt.

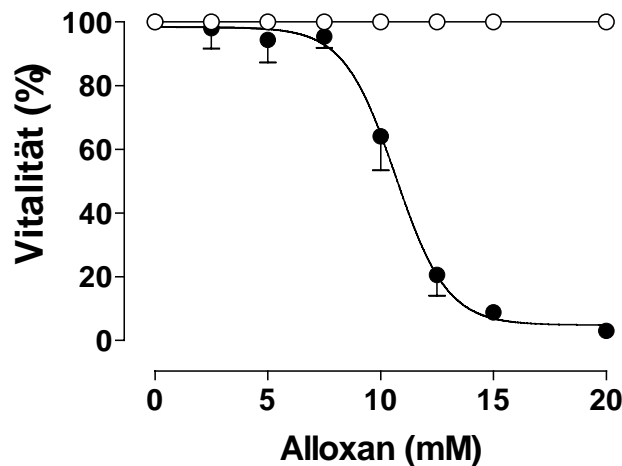


Abb. 3.30: Schädigung von RINm5F-GLUT2-Zellen und RINm5F-Kontrollzellen durch Alloxan

● = RINm5F-GLUT2-Zellen, ○ = nicht-transfizierte RINm5F-Kontrollzellen. Die Vitalität der Zellen nach einstündiger Exposition gegenüber Alloxan wurde mit Hilfe des MTT-Zytotoxizitätstests bestimmt. Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 4 unabhängigen Experimenten.

RINm5F-GLUT2-Zellen wurden konzentrationsabhängig durch Alloxan geschädigt. Bei 20 mM Alloxan waren nahezu keine vitalen Zellen mehr im MTT-Test nachweisbar. Mit Hilfe einer nicht-linearen Kurvenanpassung konnte ein EC_{50} -Wert von 10,3 mM für die halbmaximale Alloxantoxizität aus den Vitalitätsdaten berechnet werden (Tab. 3.7). Im Gegensatz dazu wurde die Vitalität von nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen durch Alloxanexposition nicht beeinträchtigt.

Streptozotocin hingegen schädigte auch nicht-transfizierte RINm5F-Kontrollzellen. Bei 20 mM Streptozotocin waren nur noch etwas mehr als die Hälfte der Zellen vital (Abb. 3.31). Die GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen zeigten im Vergleich eine weitaus stärkere konzentrationsabhängige Schädigung durch Streptozotocin.

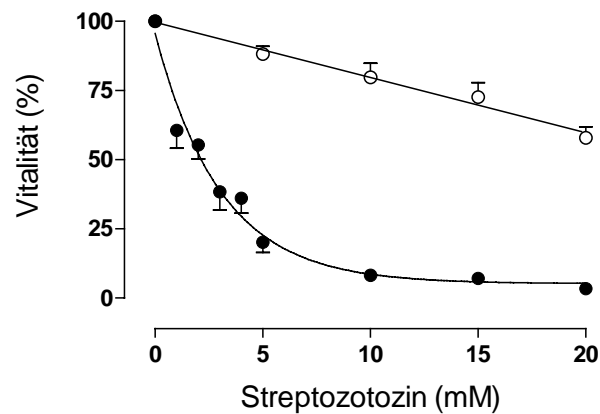


Abb. 3.31: Schädigung von RINm5F Kontrollzellen und RINm5F-GLUT2 Zellen durch Streptozotocin

● = RINm5F-GLUT2-Zellen, ○ = nicht-transfizierte RINm5F-Kontrollzellen. Die Vitalität der Zellen nach einstündiger Exposition gegenüber Streptozotocin wurde mit Hilfe des MTT-Zytotoxizitätstests bestimmt. Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 4 unabhängigen Experimenten.

Bei 2,1 mM Streptozotocin war bereits die Hälfte der RINm5F-GLUT2-Zellen abgestorben (Tab. 3.7). Für RINm5F-Kontrollzellen wurde ein EC_{50} -Wert von 25,1 mM Streptozotocin ermittelt.

Um einen möglichen Einfluß der Transfektion *per se* auf die RINm5F-Zellen auszuschließen, wurden RINm5F-Zellen, die Glucokinase überexprimieren, zu Kontrollzwecken gegenüber Alloxan und Streptozotocin exponiert. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Vitalität im Vergleich zu nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen (Tab. 3.7).

	Alloxan (mM)	Streptozotocin (mM)
RINm5F	> 20 (2)	25,1 ± 0,2 (5)
RINm5-GK	> 20 (2)	20,5 ± 0,2 (5)
RINm5F-GLUT2	10,3 ± 0,3 (5)**	2,1 ± 0,3 (5)**

Tab. 3.7: EC₅₀-Werte der Zytotoxizität von Alloxan und Streptozotocin gegenüber RINm5F-Zellen

RINm5F-Zellen wurden für 1 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Alloxan oder Streptozotocin in KR-Puffer inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und gegen RPMI-1640 Medium ausgetauscht. Nach 16 h wurde die Vitalität im MTT-Zytotoxizitätstest ermittelt. Die EC₅₀-Werte wurden durch nicht-lineare Regression aus den in den Abb. 3.30 bis Abb. 3.31 dargestellten Kurven berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM, ermittelt aus der jeweils in Klammern angegebenen Anzahl unabhängig voneinander durchgeführter Versuche. **p < 0,01 verglichen mit nicht-transfizierten RINm5F-Zellen.

3.5.2 Schutz von Glucose vor einer Schädigung von RINm5F-GLUT2-Zellen durch Alloxan und Streptozotocin

Im weiteren sollte untersucht werden, ob für die Toxizität von Alloxan und Streptozotocin eine direkte Interaktion mit Glucosebindungsstrukturen eine Rolle spielt. Hierzu wurden zunächst RINm5F-GLUT2-Zellen gleichzeitig mit 15 mM Alloxan und Glucosekonzentrationen von 0 bis 25 mM eine Stunde inkubiert. Nach 16 Stunden wurde die Vitalität im MTT-Zytotoxizitätstest gemessen.

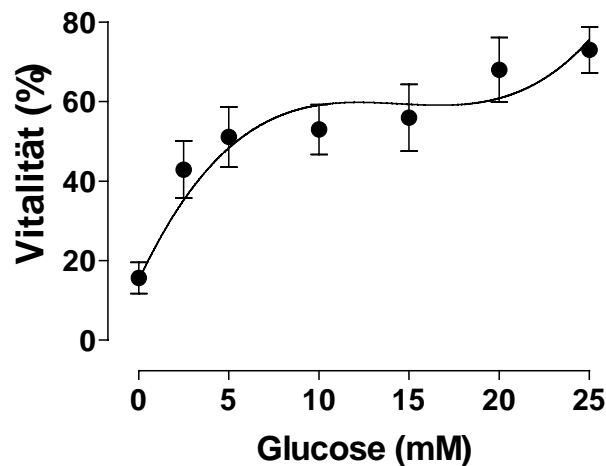


Abb. 3.32: Schutz von Glucose vor einer Schädigung von RINm5F-GLUT2-Zellen durch Alloxan

● = RINm5F-GLUT2-Zellen. Die Vitalität der Zellen nach einstündiger gleichzeitiger Inkubation mit 15 mM Alloxan und 0-25 mM Glucose wurde im MTT-Test bestimmt. Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte RINm5F-GLUT2-Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 4 unabhängigen Experimenten.

Glucose konnte konzentrationsabhängig RINm5F-GLUT2-Zellen vor einer Schädigung durch Alloxan schützen. Der EC_{50} -Wert konnte mit $11,3 \pm 3,0$ mM ($n=6$) Glucose ermittelt werden.

Ein anderes Bild ergab sich bei der Untersuchung der schützenden Wirkung von Glucose auf Streptozotocin exponierte RINm5F-Kontrollzellen und RINm5F-GLUT2-Zellen. Weder bei RINm5F-Kontrollzellen noch RINm5F-GLUT2-Zellen konnte ein Schutz vor der toxischen Streptozotocinwirkung erreicht werden. Für die gegenüber Streptozotocin empfindlicheren RINm5F-GLUT2-Zellen lag die Vitalität im gesamten Glucosekonzentrationsbereich von 0 mM bis 25 mM bei 20 %, für die Kontrollzellen nahezu unverändert um 50 %.

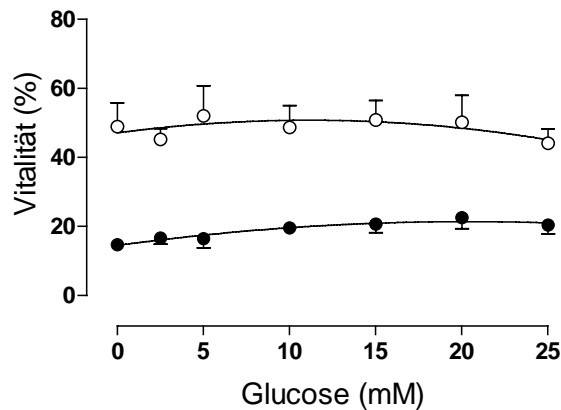


Abb. 3.33: Fehlender Schutz von Glucose vor einer Schädigung von RINm5F-GLUT2-Zellen und RINm5F-Kontrollzellen durch Streptozotocin

● = RINm5F-GLUT2-Zellen, ○ = nicht-transfizierte RINm5F-Kontrollzellen. Die Vitalität der Zellen nach einstündiger gleichzeitiger Inkubation mit 10 mM Streptozotocin und 0-25 mM Glucose wurde im MTT-Test bestimmt. Für die Vitalitätsangaben wurden jeweils unbehandelte Zellen als 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, ermittelt aus 4 unabhängigen Experimenten.

Aus der Tatsache, daß die toxische Wirkung von Alloxan, aber nicht von Streptozotocin auf RINm5F-GLUT2-Zellen durch Glucose inhibiert werden kann, läßt sich schließen, daß unterschiedliche Wirkmechanismen für die beide Noxen vorliegen. Aufgrund des Glucoseschutzes gegenüber der Alloxantoxizität können glucosebindende Strukturen als Wirkort des Alloxans angenommen werden. Um zu überprüfen, ob der GLUT2-Glucosetransporter eine dieser glucosebindenden Strukturen ist, wurden im folgenden 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahmekinetiken von bei RINm5F-GLUT2-Zellen nach Alloxan- und Streptozotocinexposition aufgenommen.

3.5.3 Einfluß von Alloxan und Streptozotocin auf den Glucosetransport von RINm5F-GLUT2-Zellen

Die Glucosetransportaktivitäten von RINm5F-GLUT2-Zellen wurden nach einstündiger Exposition gegenüber Alloxan bzw. Streptozotocin durch Aufnahmekinetiken mit 10 mM 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose (10 μ Ci/ml) quantifiziert. Die von den Zellen nach 10 bis 60 s Expositionszeit akkumulierte 3-O-Methyl[1-³H]-Glucosemenge wurde mit einem β -Szintillationszähler gemessen.

Die Exposition von RINm5F-GLUT2-Zellen gegenüber 5 mM Streptozotocin ergab keine signifikanten Unterschiede in der 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose-Aufnahme im Ver-

gleich zu Zellen, die nur mit KR-Puffer ohne Streptozotocin inkubiert wurden (Abb. 3.34).

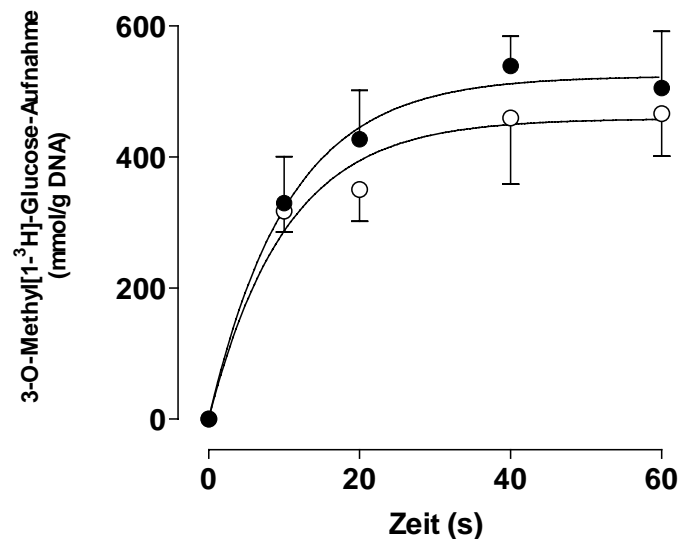


Abb. 3.34: Fehlender Einfluß von Streptozotocin auf die Transportfunktion des GLUT2-Glucosetransporters in RINm5F-GLUT2-Zellen

● = 5 mM Streptozotocin, ○ = ohne Streptozotocin. RINm5F-GLUT2-Zellen wurden für 1 h bei 37 °C gegenüber 5 mM Streptozotocin in KR-Puffer bzw. KR-Puffer ohne Streptozotocin exponiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C mit 10 mM 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose (10 µCi/ml) in KR-Puffer für 10-120 s inkubiert. Die von den Zellen aufgenommene 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose wurde im β-Szintillationszähler quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 6 Experimenten.

Alloxan zeigte hingegen einen signifikanten Effekt ($p < 0,05$) auf den Glucosetransport. Die Aufnahme von 10 mM 3-O-Methyl-Glucose von RINm5F-GLUT2-Zellen wurde durch 15 mM Alloxan nach 60 s um über 50 % im Vergleich zu Zellen, die nur mit KR-Puffer ohne Alloxan inkubiert wurden, inhibiert (Abb. 3.35).

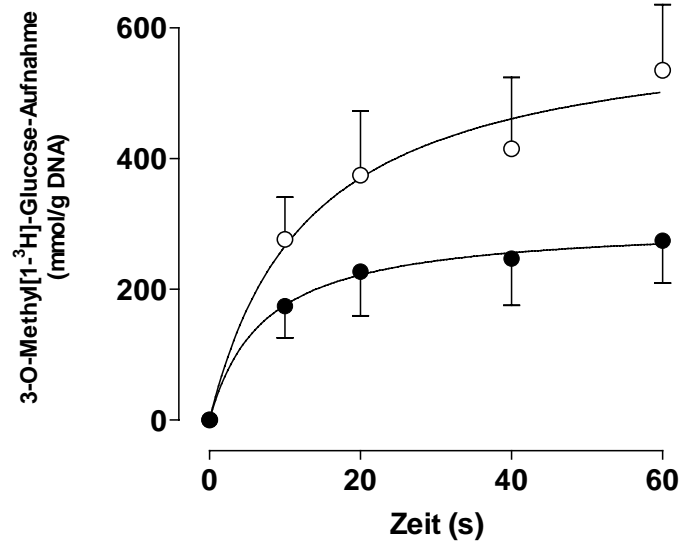


Abb. 3.35: Inhibierung der Transportfunktion des GLUT2-Glucosetransporters in RINm5F-GLUT2-Zellen durch Alloxan

● = 15 mM Alloxan, ○ = ohne Alloxan. RINm5F-GLUT2-Zellen wurden für 1 h bei 37 °C gegenüber 15 mM Alloxan in KR-Puffer bzw. KR-Puffer ohne Alloxan exponiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C mit 10 mM 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose (10 μCi/ml) in KR-Puffer für 10-120 s inkubiert. Die von den Zellen aufgenommene 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose wurde im β-Szintillationszähler quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 4 Experimenten.

In Versuchen, bei denen nicht-transfizierte RINm5F-Kontrollzellen gegenüber 15 mM Alloxan exponiert wurden, war keine Inhibierung der 3-O-Methyl-Glucoseaufnahme zu messen (Abb. 3.36). Aus diesen Beobachtungen läßt sich schließen, daß Alloxan einen spezifischen inhibierenden Effekt auf die Transportfunktion des GLUT2-Glucosetransporters (Abb. 3.37) besitzt.

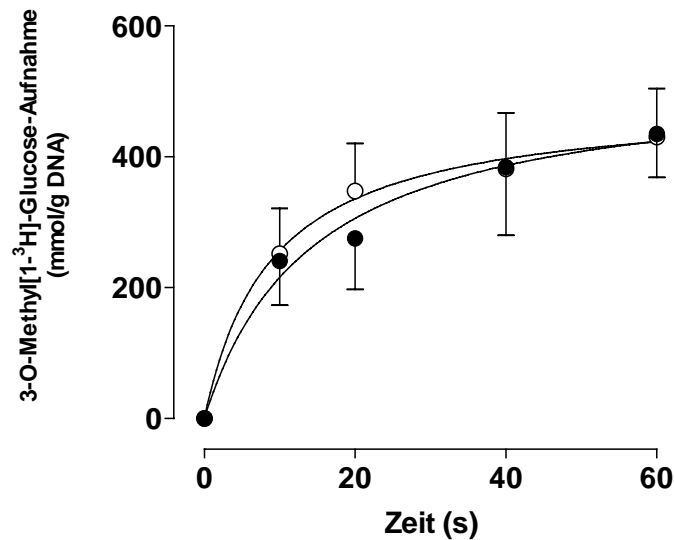


Abb. 3.36: Fehlender Einfluß von Alloxan auf den Glucosetransport von nicht-transfizierten RINm5F-Zellen

● = 15 mM Alloxan, ○ = ohne Alloxan. RINm5F-Zellen wurden für 1 h bei 37 °C gegenüber 15 mM Alloxan in KR-Puffer bzw. KR-Puffer ohne Alloxan exponiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C mit 10 mM 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose (10 µCi/ml) in KR-Puffer für 10-120 s inkubiert. Die von den Zellen aufgenommene 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose wurde im β-Szintillationszähler quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 4 Experimenten.

Um auszuschließen, daß durch die Transfektion *per se* eine Sensibilisierung der RINm5F-Zellen gegenüber Alloxan eingetreten war, wurden 3-O-Methyl-Glucose-Aufnahmekinetiken von Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen aufgenommen. Auch bei ihnen war wie bei den nicht-transfizierten RINm5F- Kontrollzellen keine Veränderung der 3-O-Methylglucose-Aufnahme nach Alloxaninkubation zu beobachten (Abb. 3.37).

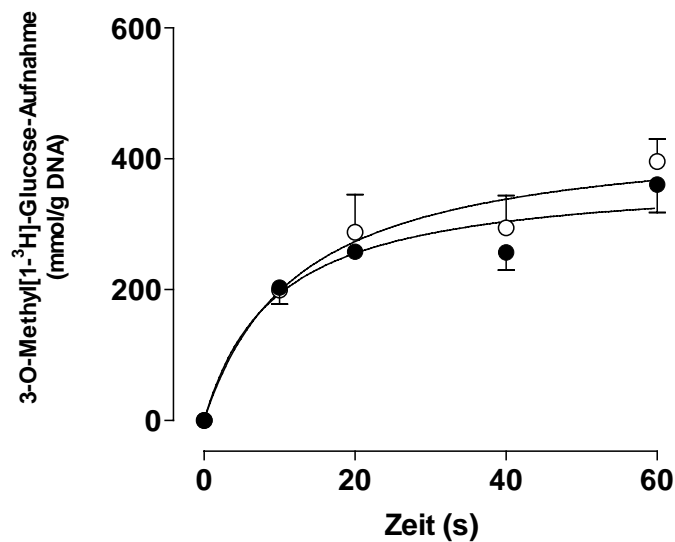


Abb. 3.37: Fehlender Einfluß von Alloxan auf den Glucosetransport von Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen

● = 15 mM Alloxan, ○ = ohne Alloxan. RINm5F-GK-Zellen wurden für 1 h bei 37 °C gegenüber 15 mM Alloxan in KR-Puffer bzw. KR-Puffer ohne Alloxan exponiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C mit 10 mM 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose (10 µCi/ml) in KR-Puffer für 10-120 s inkubiert. Die von den Zellen aufgenommene 3-O-Methyl[1-³H]-Glucose wurde im β-Szintillationszähler quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von 4 Experimenten.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung von Glucokinase- und GLUT2-Glucosetransporter für die glucoseinduzierte Insulinsekretion von RINm5F-Zellen

Für die Gentherapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus stellt die Generierung von Surrogatzellen aus insulinproduzierenden Gewebekulturzelllinien ein erfolgsversprechendes Konzept dar. Surrogatzellen bieten im Vergleich zu humanen Spenderpankreaten den Vorteil der unbegrenzten Verfügbarkeit und bergen weniger Risiken für die biologische Sicherheit des Empfängers als Xenotransplantate. Die wichtigste Voraussetzung für den Einsatz von insulinproduzierenden Surrogatzellen ist allerdings die bedarfsgerechte Sekretion von Insulin auf physiologische Glucosekonzentrationen. Es war das Ziel der vorliegenden Dissertation zu zeigen, daß es möglich ist, durch Überexpression der Glucokinase und des GLUT2-Glucosetransporters, zweier für die glucoseinduzierte Insulinsekretion der pankreatischen B-Zelle wichtiger Signalerkennungsstrukturen, eine Glucoseresponsivität der Insulinsekretion von RINm5F-Gewebekulturzellen im physiologischen millimolaren Konzentrationsbereich zu erzielen.

Die in der vorliegenden Dissertationsarbeit verwendete insulinproduzierende RINm5F-Zelllinie zeigte weder in der niedrigen (19.) noch in der hohen (89.) Passage eine glucoseinduzierte Insulinsekretion im mikromolaren oder millimolaren Konzentrationsbereich (Halban *et al.* 1983). In *Northern-* und *Western-Blot-Analysen* konnte die Expression der Glucokinase, einem Schlüsselenzym für die physiologische glucoseinduzierte Insulinsekretion der pankreatischen B-Zelle, in dieser Gewebekulturzelllinie nur sehr schwach nachgewiesen werden. In RINm5F-Zellen hoher Passage war zudem eine Expression des in der B-Zelle vorherrschenden Glucosetransporters GLUT2 in *Northern-* und *Western-Blot-Analysen* nicht detektierbar.

Der niedrigaffine GLUT2-Glucosetransporter und das niedrigaffine glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase stellen den „Glucoseerkennungsapparat“ der pankreatischen B-Zelle dar, der es ermöglicht, millimolare Glucosekonzentrationen an den signalgenerierenden Metabolismus zu koppeln (Lenzen & Panten 1988b; Lenzen 1992a). Dabei übersteigt die Kapazität des GLUT2 mediierten Glucosetransportes die Phosphorylierungskapazität der Glucokinase um das fünfzig- bis hundertfache. Jedoch

konnte der vollständige Verlust der glucoseinduzierten Insulinsekretion in pankreatischen B-Zellen von GLUT2-*knockout*-Mäusen die Bedeutung des niedrigaffinen Glucosetransporters für die Signalerkennung klar belegen (Guillam *et al.* 1997). Eine Erhöhung des Glucosemetabolismus führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ratio von ATP zu ADP. Die erhöhte ATP/ADP-Ratio bedingt ein Schließen von ATP-sensitiven Kaliumkanälen in der Plasmamembran. Durch die sich anschließende Depolarisation der Plasmamembran werden spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet, so daß Calciumionen in die Zelle einströmen und das Signal zur Exozytose von Insulingranula geben (Waldhäusl & Lenzen 1997).

Um die im Verhältnis zur Hexokinase niedrige Expression der Glucokinase in RINm5F-Zellen zu korrigieren, wurde durch molekularbiologische Techniken das Enzym stabil überexprimiert. Durch liposomale Transfektion mit dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3-GK wurde die cDNA der Glucokinase unter Kontrolle des CMV-Promotors stabil in RINm5F-Zellen überexprimiert. Dabei wurde, wie durch *Northern*- und *Western-Blot*-Analysen nachgewiesen werden konnte, ein mit der Leber vergleichbares Expressionsniveau erreicht. Die Überexpression der Glucokinase in den RINm5F-GK-Zellklonen bestätigte sich auch in enzymkinetischen Messungen der Glucosephosphorylierungsaktivitäten in den Zellhomogenaten. Die Phosphorylierungsaktivitäten von RINm5F-GK-Zellhomogenaten waren verglichen mit denen nicht-transfizierter Kontrollzellen um mehr als das 10fache erhöht. Damit wurde ein Anteil der Phosphorylierungsaktivität der Glucokinase an der Gesamtphosphorylierungsaktivität in den Zellen von über 50 % erreicht. Dieser Wert ist mit dem von pankreatischen B-Zellen vergleichbar. RINm5F-Zellen zeigen wie zahlreiche andere insulinproduzierende Tumorzelllinien eine zur pankreatischen B-Zelle stark erhöhte Expression der Hexokinase, wodurch der Phosphorylierungsanteil der Glucokinase auf unter 10 % sinkt (Efrat *et al.* 1993; Hohmeier *et al.* 1997). Die absoluten Glucokinaseaktivitäten änderten sich im Vergleich zu pankreatischen Ratteninseln nicht signifikant. Für eine glucoseinduzierte Insulinsekretion im millimolaren Konzentrationsbereich scheint jedoch das Verhältnis der Phosphorylierungsaktivitäten von Glucokinase zu Hexokinase eine wichtigere Rolle zu spielen als die absoluten Phosphorylierungsaktivitäten (Heimberg *et al.* 1993; Ishihara *et al.* 1993a; Becker *et al.* 1994). So konnte durch eine kombinierte Transfektion von RIN1046-38 Insulinomzellen mit GLUT2-Glucosetransporter und Glucokinase

zwar eine stimulierbare Insulinsekretion erreicht werden, eine konzentrationsabhängige Responsivität gegenüber millimolaren Glucosekonzentrationen war jedoch nur in Anwesenheit von Thioglucose, einem kompetitiven Inhibitor der hochaffinen Hexokinasen, möglich (Clark *et al.* 1997; Hohmeier *et al.* 1997). Dieser Effekt ist einer unzureichend niedrigen Glucokinase/Hexokinase-Aktivitätsratio zuzuschreiben, die keine Kopplung millimolarer Glucosekonzentrationen in Anwesenheit der weiterhin hohen Hexokinaseaktivitäten erlaubt.

Durch die Überexpression der Glucokinase in RINm5F-Zellen der niedrigen Passage konnte auch ohne den Einsatz von Hexokinase-Inhibitoren eine glucosestimulierte Insulinsekretion bei millimolaren Konzentrationen erreicht werden. Dabei war ein Anstieg der Insulinsekretion in statischen Glucoseinkubationen bei dem RINm5F-GK-2-Zellklon auf das 2,6fache der Basalsekretion zu beobachten. Bei nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen war hingegen keine Glucoseresponsivität der Insulinsekretion im mikromolaren und millimolaren Konzentrationsbereich nachzuweisen. Die Insulinsekretion der Kontrollzellen ist offensichtlich schon bei mikromolaren Glucosekonzentrationen maximal stimuliert, wie sich aus der 3,7fach höheren Basalsekretion im Vergleich zu RINm5F-GK-Zellen ersehen läßt. Zu analogen Ergebnissen kamen Versuche mit Hexokinase-überexprimierenden pankreatischen Ratteninseln, bei denen schon bei niedrigen millimolaren Glucosekonzentrationen die Insulinsekretion maximal stimuliert war (Becker *et al.* 1994).

Durch eine stabile Überexpression der Glucokinase in RINm5F-Zellen hoher Passage konnte nur bei 1 mM Glucose eine 1,5fache Stimulierbarkeit der Insulinsekretion gegenüber der basalen Sekretion erreicht werden. Das Expressionsniveau der Glucokinase in RINm5F-GK-Zellen hoher Passage entsprach, wie in *Northern-* und *Western-Blot*-Analysen und Messungen der Glucosephosphorylierung gezeigt werden konnte, dem der Zellen in niedriger Passage.

Durch Bestimmung der Glucoseoxidation in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration wurde darüber hinaus sowohl für die RINm5F-GK-Zellen niedriger als auch hoher Passage eine Kopplung der Glucokinase an den oxidativen Metabolismus der Zellen nachgewiesen. Die Glucoseoxidation stieg im Bereich von 100 μ M bis 2 mM um das 4fache an. Die leichte Abnahme der Glucoseoxidation bei 10 mM Glucose ist vermutlich auf die allosterische Hemmung der Hexokinase durch das vermehrt über die

Glucokinase gebildete Glucose-6-phosphat zurückzuführen. Hierfür spricht, daß bei nicht-transfizierten Kontrollzellen die Glucoseoxidation im Bereich von 100 μ M bis 10 mM Glucose unverändert blieb.

Die Bedeutung des GLUT2-Glucosetransporters für die glucoseinduzierte Insulinsekretion der pankreatischen B-Zelle konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden. So ist die GLUT2-Expression in B-Zellen von Tiermodellen des nicht-insulinpflichtigen Diabetes mellitus drastisch erniedrigt (Johnson *et al.* 1990; Orci *et al.* 1990a; Orci *et al.* 1990b; Unger 1991; Chen *et al.* 1992; Brant *et al.* 1993; Ohneda *et al.* 1993; Ohneda *et al.* 1994; Thorens & Roduit 1994). Darüber hinaus konnten Studien an transgenen *knock-out*-Mäusen klar belegen, daß eine Ausschaltung des GLUT2-Glucosetransporters mit einer schweren diabetischen Stoffwechsellage einhergeht und somit für die Funktion der pankreatischen B-Zelle von essentieller Bedeutung ist (Guillam *et al.* 1997). Auch in insulinproduzierenden Gewebekulturzellen ist eine glucoseinduzierte Insulinsekretion von der Expression des GLUT2-Glucosetransporters abhängig (Miyazaki *et al.* 1990; Hughes *et al.* 1992; Hughes *et al.* 1993; Tiedge *et al.* 1993a; Ferber *et al.* 1994; Hohmeier *et al.* 1997). So konnte nur durch die Überexpression des niedrigaffinen GLUT2- und des hochaffinen GLUT1-Glucosetransporters in der neuroendokrinen Zelllinie AtT20ins eine glucoseinduzierte Insulinsekretion mit einem Maximum bei 2,5 mM Glucose erreicht werden (Hughes *et al.* 1993). Für den Glucosemetabolismus in den AtT20ins-Zellen ergaben sich trotz deutlicher Unterschiede in den Glucosetransportkapazitäten keine signifikanten Abweichungen zwischen den GLUT1- und GLUT2-Transfektanden. Demnach ist der Glucosetransport in die Zellen für den Glucosemetabolismus nicht limitierend. Auch kinetische Untersuchungen an pankreatischen Ratteninseln bzw. B-Zellen ergaben Glucosetransportkapazitäten, die 50- bis 100fach höher waren als die Glucosephosphorylierungskapazitäten (Tal *et al.* 1992; Heimberg *et al.* 1993).

Bei den im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit verwendeten insulinproduzierenden RINm5F-Zellen hoher und niedriger Passage lagen die Glucosetransportkapazitäten ebenfalls deutlich über den Glucoseoxidationswerten, wobei die GLUT2-Expression in RINm5F-Zellen hoher Passage deutlich erniedrigt war. Durch die stabile Überexpression des GLUT2-Glucosetransporters konnte die Glucosetransportkapazität von RINm5F-Zellen verdoppelt werden. Dies führte jedoch zu keiner signifikanten

Änderung der Glucoseoxidation im Vergleich zu nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen. Damit wurde bestätigt, daß der Glucosetransport in die Zelle für den Glucosemetabolismus und somit letztlich auch für die glucoseinduzierte Insulinsekretion in RINm5F-Zellen nicht limitierend ist und eine signalgenerierende Funktion nur im Zusammenspiel mit der Glucokinase besitzt.

Von Hughes *et al.* (1993) wurde aufgrund ähnlicher Resultate mit GLUT1- und GLUT2-überexprimierenden AtT20ins-Zellen für den GLUT2-Glucosetransporter eine über die Transportfunktion hinausgehende Rolle für die glucosestimulierte Insulinsekretion postuliert. Für die Hypothese eines *substrate channeling*, bei dem z. B. der GLUT2-Glucosetransporter und die Glucokinase interagieren und einen Komplex bilden, konnten aber bislang keine stichhaltigen experimentellen Befunde erbracht werden. Die Ergebnisse in der vorliegenden Dissertationsarbeit unterstreichen die herausragende Bedeutung der Glucokinase, die mit dem GLUT2-Glucosetransporter für eine korrekte Stimulus-Sekretions-Kopplung in insulinproduzierenden Zellen verantwortlich ist.

Dies zeigte sich eindrucksvoll an den sekretorischen Charakteristika von RINm5F-GK-Zellen hoher Passage, die sich trotz einer ausgeglichenen Glucokinase/Hexokinase-Ratio durch ein sehr niedriges Expressionsniveau des GLUT2 Glucosetransporters auszeichneten. Die Glucokinaseüberexpression führte hier zu einer deutlich schwächeren glucoseinduzierten Insulinsekretion mit einem sekretorischen Maximum im subphysiologischen Konzentrationsbereich von 1 mM Glucose. Im Gegensatz hierzu war durch die Überexpression der Glucokinase in RINm5F-Zellen niedriger Passage, die den GLUT2-Glucosetransporter konstitutiv exprimieren, eine glucoseinduzierte Insulinsekretion bei millimolaren Konzentrationen *in vitro* unter Zellkulturbedingungen zu erreichen. Der RINm5F-GK-Zellklon 2, der die höchste glucoseinduzierte Insulinsekretion aufwies, wurde für Implantationen in diabetische immundefiziente Ratten ausgewählt, um die Leistungsfähigkeit von glucoseresponsiven insulinproduzierenden Surrogatzellen unter *in vivo* Bedingungen zu charakterisieren, mit dem Ziel der Verbesserung einer diabetischen Stoffwechsellaage.

4.2 Implantation von RINm5F-GK-Surrogatzellen in diabetische immundefiziente Ratten

Die Fähigkeit von insulinproduzierenden Surrogatzellen, das Hormon bedarfsgerecht zu sezernieren, spielt eine zentrale Rolle für die Therapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus. Die glucoseresponsiven RINm5F-GK-Zellen bieten für die Implantation in einen diabetischen Organismus günstige Voraussetzungen. Die molekularbiologischen Manipulationen der Genexpression erfolgten durch physikalische Transfektion mit Vektoren der niedrigsten Sicherheitsstufe. Zudem sind RINm5F-Insulinomzellen als strahlungsinduzierte permanente Gewebekulturzellen schon seit über 20 Jahren in der experimentellen Diabetologie etabliert und unter dem Aspekt des onkogen transformierenden Potentials und der Freisetzung von infektiösen Agentien als ungefährlich einzustufen. Dies gilt nicht für insulinproduzierende Zelllinien wie z. B. der MIN-6 und β -TC, die durch virale bzw. onkogene Transformation immortalisiert wurden. Zudem benötigt die RINm5F-Zelllinie keine Zellkultursupplemente wie z. B. Mercaptoethanol für die INS-1-Zelllinie und IBMX und Thioglucose für die RIN1046-38 Zellen. Für die Transplantationsexperimente wurde der RINm5F-GK-Zellklon 2 ausgewählt, der unter *in vitro* Bedingungen die stärkste Glucoseresponsivität der Insulinsekretion zeigte. Als Empfängertiere dienten immundefiziente *RNU*- und *NZNU*-Ratten, bei denen durch Injektion von Streptozotocin eine diabetische Stoffwechsellage (BZ > 20 mmol/l) induziert wurde. Die RINm5F-GK-2-Zellsuspension und zum Vergleich nicht-transfizierte Kontrollzellen wurden subkutan zwischen die Schulterblätter injiziert. Durch die Implantation von RINm5F-GK-Zellen konnte im Vergleich zu Kontrollzellen eine prolongierte Normalisierung der diabetischen Stoffwechsellage mit Blutglucosewerten um 10 mmol/l über einen Zeitraum von 2 bis 3 Wochen erreicht werden. Nach einer oralen Glucosebelastung zeigten Ratten, denen RINm5F-GK-Zellen implantiert wurden, eine Verdopplung der Seruminsulinkonzentrationen, wohingegen die Seruminsulinkonzentrationen der mit Kontrollzellen implantierten Ratten unverändert blieben.

Nach Explantation der gut vaskularisierten RINm5F-GK-Zellformationen konnte durch *Northern-Blot*-Analysen gezeigt werden, daß die Genexpression der überexprimierten Glucokinase, des GLUT2-Glucosetransporters sowie des Insulingens durch die Implantation nicht beeinträchtigt wurden. Ratten, denen nicht-transfizierte Kontrollzellen

implantiert wurden, zeigten wegen der hohen Basalsekretionsrate, einer fehlenden glucoseinduzierten Insulinsekretion und einer leicht erhöhten Zellproliferationsrate fünf Tage nach Implantation einen deutlichen Abfall der Blutglucosekonzentrationen in den hypoglykämischen Bereich < 2 mM. Obwohl die RINm5F-GK Zellen nach der Implantation eine Proliferation zeigten, waren ihre *in vivo* Charakteristika im Hinblick auf die Zunahme der Zellmasse, die Korrektur der Hyperglykämie und vor allem die *in vivo* Glucoseresponsivität deutlich besser als die der RINm5F-Kontrollzellen. Moderne Zellverkapselungstechniken mit semipermeablen Materialien bieten die Möglichkeit, aufgrund der Oberflächeneigenschaften das Wachstum von Zellen zu inhibieren. So konnte kürzlich in Studien an insulinsezernierenden β -TC6-F7-Zellen, die mit Alginat-poly-L-Lysin mikroverkapselt und Versuchstieren implantiert wurden, eine Hemmung der Zellproliferation über einen Zeitraum von 60 Tagen nachgewiesen werden (Mamujee *et al.* 1997). Solche Verkapselungstechniken bieten darüber hinaus die Möglichkeit der Immunisolation des Implantates gegenüber dem Empfängerorganismus, wodurch eine mit Nebenwirkungen verbundene medikamentöse Immunsuppression vermieden wird. So konnten in Mikrokapseln, in die MIN6-Zellen eingebettet wurden, keine Anzeichen einer zellulären Infiltration nach Xenotransplantation nachgewiesen werden (Kawakami *et al.* 1997). Ein zentrales Problem bei der Verkapselung von Zellen besteht zur Zeit noch darin, biokompatible Polymere zu finden, die durch ihre spezifische Permeabilität in der Lage sind, implantierte Zellen effektiv vor einer Immunreaktion zu schützen, aber die Zellen gleichzeitig so zu kultivieren, daß eine optimale Versorgung mit Nährstoffen ermöglicht wird (Kawakami *et al.* 1997).

Ein molekularbiologischer Ansatz zur Kontrolle der Proliferation von insulinproduzierenden Zellen wurde an der β -TC-Maus-Insulinomzelllinie verfolgt (Efrat 1998). Die β -TC-tet-Zelllinie entstammt B-Zellen einer transgenen Maus, die durch das SV40-Large-T-Antigen unter Kontrolle eines tetracyclinresponsiven Promotors immortalisiert wurden (Efrat *et al.* 1995). Die funktionelle Analyse dieser Zellen zeigte, daß die transformierten B-Zellen einen hohen Differenzierungsgrad aufwiesen mit einem Insulingehalt, der 30 % der normalen B-Zelle betrug, sowie einer Insulinantwort auf physiologische Glucosekonzentrationen. Die mitotische Aktivität der β -TC-tet-Zellen ließ sich durch die tetracyclinabhängige Aktivität des onkogenen SV40-T-Antigens kontrol-

lieren. Die Proliferation von in Mäusen implantierter β -TC-tet-Zellen konnte durch Tetracyclinpellets, die die Substanz *in vivo* retardiert freisetzen, verhindert werden (Fleischer *et al.* 1998). Trotz der guten *in vitro* Regulierbarkeit der T-Antigen transformierten Zellen ist das potentielle Risiko für einen diabetischen Empfängerorganismus sehr hoch, da (1) ein konstant hoher Tetracyclinspiegel im Blut aufrechterhalten werden müßte, um eine Proliferation der transplantierten Zellmasse zu verhindern und (2) eine Übertragung des T-Antigens auf andere Gewebe (z. B. hämatopoietische Zellen) nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem ist kritisch anzumerken, daß außer dem SV40-T-Antigen noch zusätzliche Onkogene in den immortalisierten B-Zellen aktiviert sein müßten, da nur ein geringer Prozentsatz der T-Antigen exprimierenden B-Zellen in den transgenen Mäusen eine Tumorentwicklung zeigte. Für die biologische Sicherheit sind deshalb insulinproduzierende Zelllinien, die aus strahlungsinduzierten Tumoren generiert wurden, wie z. B. die RINm5F-Zelllinie, als günstiger zu beurteilen.

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Implantationsstudien mit RINm5F-GK-Zellen an diabetischen Tieren belegen das Potential von gentechnisch veränderten glucoseresponsiven Gewebekulturzellen für die Korrektur einer schweren diabetischen Stoffwechsellage. Als ein quasi unerschöpfliches Reservoir stellen diese Zellen unter Bedingungen einer optimierten Immunisolation in semipermeable Membranen ein zukunftsweisendes Therapiekonzept zur Behandlung des insulinpflichtigen Diabetes mellitus dar.

4.3 Untersuchungen zur Regulation der Glucokinase-Enzymaktivität in Glucokinase-überexprimierenden RINm5F-Zellen hoher Passage

Für die Signalvermittlungsmechanismen, die zu einer Modulation von Enzymaktivitäten führen, spielen häufig Proteininteraktionen eine Rolle. Eine solche Proteininteraktion liegt auch bei der Regulation der Glucokinase-Enzymaktivität in der Leber durch das Glucokinase-regulatorische Protein vor, das von Van Schaftingen und Mitarbeitern 1989 isoliert werden konnte (van Schaftingen *et al.* 1992; Van Schaftingen 1993; Van Schaftingen *et al.* 1994). Ausgangspunkt für die Suche nach einem regulatorischen Faktor der Leberglycolyse war die Beobachtung, daß D-Fruktose die Glucosephos-

phorylierung in der Leber zu stimulieren vermochte (Van Schaftingen 1989a). Durch umfangreiche Interaktionsstudien zellulärer Leberzellextrakte konnte schließlich ein 68,5-kDa-Protein aufgereinigt und kloniert werden (Van Schaftingen 1989a; Detheux *et al.* 1993). Dieses Protein hemmt die Glucokinaseaktivität durch Interaktion mit dem Enzymprotein in Abhängigkeit der Fructosemetaboliten Fructose-1-phosphat (Inhibition der GK-Interaktion) und Fructose-6-phosphat (Stimulation der GK-Interaktion). Hierbei ist der Mechanismus der Enzyminhibition kompetitiv, d. h. der K_m -Wert des Proteins wird verändert (Vandercammen & Van Schaftingen 1990; Detheux *et al.* 1991; Vandercammen & Van Schaftingen 1991). Durch selektive Permeabilisierungstechniken mit Digitonin und Triton X-100 konnte gezeigt werden, daß die fructoseabhängige Glucokinasebindung an das Regulatorprotein mit einer Kompartimentierung des Enzymproteins verbunden ist (Agius & Peak 1993; Agius 1994; Agius *et al.* 1995). Das Glucokinaseregulatorische Protein fungiert als sogenanntes „*Docking Protein*“, das die Glucokinase der diffusiblen Zytoplasmafraktion entzieht und in Abhängigkeit von den metabolischen Bedingungen einen Transfer zwischen Nukleus (Fastenbedingungen) und Zytoplasma (Wiederfütterungsbedingungen) bewirkt (Toyoda *et al.* 1994; Agius *et al.* 1995; Toyoda *et al.* 1995a; Toyoda *et al.* 1995b).

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde die intrazelluläre Glucokinasebindung als möglicher Mechanismus einer posttranslationalen Glucokinaseregulation in insulinsezernierenden Zellen durch selektive Permeabilisierungstechniken untersucht (Agius & Peak 1993; Agius 1994). Da die Glucokinase in Inselzellen des Pankreas nur 10 % des Expressionsniveaus der Leber besitzt, wurden die Untersuchungen überwiegend an gentechnisch veränderten RINm5F-Zellen durchgeführt, in denen die Glucokinase auf ein der Leber vergleichbares Niveau überexprimiert war. Die selektive Eröffnung des zytoplasmatischen Kompartiments durch Digitoninpermeabilisierung führte in den gentechnisch veränderten RINm5F-GK-Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Freisetzung von 90 % der Glucokinasegesamtaktivität. Im Gegensatz dazu waren 70 % der Gesamthexokinaseaktivität intrazellulär gebunden, was durch eine Interaktion des Enzymproteins mit dem mitochondrialen Kompartiment erklärt werden kann (Adams *et al.* 1988; Malaisse & Malaisse 1988; Brdiczka & Wallimann 1994).

Wurden die spezifischen Glucokinase-Enzymaktivitäten auf den durch *Western-Blot*-Analysen quantifizierten zellulären Glucokinaseproteingehalt bezogen, ergaben sich für die intrazelluläre gebundene Glucokinasefraktion geringere spezifische Enzymaktivitäten als für die diffusible Fraktion. Die geringen spezifischen Enzymaktivitäten nach Zellyse durch Triton-X 100 wurden nur an intakten Zellen beobachtet. Triton X-100 hatte weder einen Einfluß auf das Meßsystem der Glucosephosphorylierung noch auf die Enzymaktivität eines aufgereinigten rekombinanten Glucokinaseproteins. Die Hexokinaseaktivitäten wurden in Ultraschallhomogenaten ebenfalls nicht durch Triton X-100 inhibitorisch beeinflusst. Demnach mußte ein zellulärer Faktor, der durch Triton X-100 freigesetzt wird, die Glucokinaseaktivität spezifisch hemmen. Eine generelle Denaturierung von zellulären Proteinen durch das nichtionische Detergenz Triton X-100 scheidet als Erklärungsmöglichkeit für die Abnahme der spezifischen Aktivität aus, da sonst (1) auch die Hexokinaseaktivitäten durch Triton X-100 inhibiert worden sein müßten und (2) das rekombinante Glucokinaseprotein in seiner Aktivität beeinträchtigt worden wäre.

Für einen zellulären regulatorischen Faktor der Glucokinase spricht zudem, daß nach der Zugabe von aufgereinigter rekombinanter B-Zellglucokinase zu einem RINm5F-Zellextrakt in Gegenwart von Triton X-100 die Aktivität der rekombinanten Glucokinase gehemmt wird. Der Aktivitätsverlust der Glucokinase konnte jedoch vermieden werden, wenn zuvor eine Inaktivierung der Proteine im RINm5F-Zellextrakt mittels immobilisierter Proteinase K oder durch Hitzebehandlung herbeigeführt wurde. Diese Ergebnisse sprechen für einen bisher unbekanntem Proteinfaktor, welcher in insulinsezierenden Zellen mit der Glucokinase direkt interagiert. Die durch Triton X-100 bewirkte Hemmung der Glucokinase-Enzymaktivität ist kein Spezifikum der RINm5F-GK-Gewebekulturzellen, da die Effekte ebenfalls an dispergierten Inselzellen von *ob/ob*-Mäusen (B-Zellanteil > 90 %) nachgewiesen werden konnten.

4.4 Effekt einer GLUT2-Glucosetransporter-Überexpression auf die Zytotoxizität der diabetogenen Noxen Alloxan und Streptozotocin bei RINm5F-Zellen hoher Passage

Die diabetogenen Substanzen Alloxan und Streptozotocin sind in der experimentellen Diabetologie seit langem wegen ihrer spezifischen B-Zelltoxizität etabliert. Mit ihnen lassen sich molekulare Zellschädigungsmechanismen studieren wie sie in der pankreatischen B-Zelle bei der Manifestation eines Diabetes mellitus ablaufen. Alloxan und Streptozotocin können in biologischen Systemen Sauerstoffradikale bzw. NO freisetzen, die auch bei der Zerstörung der B-Zellen im Autoimmundiabetes von Lymphozyten freigesetzt werden (Joannides *et al.* 1997).

Der Mechanismus der spezifischen B-Zelltoxizität von Alloxan und Streptozotocin ist dabei im Detail noch nicht geklärt. Aufgrund der sterischen Ähnlichkeit beider Substanzen zum Glucosemolekül wird u. a. ein spezifischer Transport als Ursache für die Toxizität in die pankreatische B-Zelle diskutiert (Malaisse *et al.* 1982; Lenzen *et al.* 1988a; Munday *et al.* 1993; Schnedl *et al.* 1994; Jorns *et al.* 1997). In Gewebekulturzelllinien, in denen der für die pankreatische B-Zelle typische Glucosetransporter GLUT2 überexprimiert wurde, konnten Schnedl *et al.* 1994 eine gegenüber nicht-transfizierten Zellen erhöhte Aufnahme von Streptozotocin nachweisen.

Durch die Überexpression des GLUT2-Glucosetransporters in RINm5F-Zellen hoher Passage stand ein ideales Modell zur Untersuchung der Bedeutung des GLUT2-Glucosetransporters für die Toxizität der diabetogenen Substanzen Alloxan und Streptozotocin zur Verfügung. In nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen war eine Expression des GLUT2-Glucosetransporters nicht nachweisbar, so daß in diesen Zellen konstitutiv nur der GLUT1-Glucosetransporter exprimiert wurde (Tiedge *et al.* 1993a).

Im MTT-Zytotoxizitätstest konnte nachgewiesen werden, daß Streptozotocin RINm5F-GLUT2-Zellen effektiv schädigte ($EC_{50} = 2,1$ mM). Nicht-transfizierte RINm5F-Kontrollzellen reagierten weitaus weniger sensitiv ($EC_{50} = 25,1$ mM). Diese Ergebnisse bestätigten Beobachtungen von Schnedl *et al.* 1994, bei denen ebenfalls eine erhöhte Toxizität bei GLUT2-überexprimierenden RIN1046-38- und AtT20-Zellen im Vergleich zu GLUT1-überexprimierenden Zellen zu verzeichnen war.

Alloxan hatte ebenfalls eine konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung auf RINm5F-GLUT2-Zellen. Nicht-transfizierte RINm5F-Kontrollzellen waren unempfindlich gegenüber Alloxan. Anders als bei Streptozotocin ließ sich aber die Toxizität durch Glucose konzentrationsabhängig reduzieren. Hieraus ließ sich schließen, daß für die Toxizität des Alloxans eine Interaktion der Noxe mit einer glucosebindenden Struktur verantwortlich ist. Eine solche Interaktion von Alloxan und einer Glucosebindungsstruktur konnte z. B. durch die Hemmung der glucosephosphorylierenden Aktivität der Glucokinase durch Alloxan nachgewiesen werden (Lenzen & Munday 1991). Auch bei der Glucokinase konnte eine Koinkubation mit Glucose das Enzym vor der hemmenden Wirkung des Alloxans schützen. Als Zielstruktur des Alloxans in den RINm5F-GLUT2-Zellen scheidet die Glucokinase aber aus, weil ihre Expression in den RINm5F-GLUT2-Zellen nicht erhöht wurde.

Durch 3-O-Methyl-Glucoseaufnahmekinetiken wurde der Einfluß von Alloxan und Streptozotocin auf den Glucosetransport in RINm5F-GLUT2-Zellen untersucht. Eine Streptozotocinexposition führte dabei zu keiner signifikanten Änderung der 3-O-Methyl-Glucoseaufnahme von RINm5F-GLUT2-Zellen. Eine Inkubation mit Alloxan hingegen reduzierte die 3-O-Methyl-Glucoseaufnahme um mehr als 50 %. Bei nicht-transfizierten RINm5F-Kontrollzellen, die konstitutiv nur den GLUT1-Glucosetransporter exprimierten, waren keine signifikanten Unterschiede der 3-O-Methyl-Glucoseaufnahme zwischen mit Alloxan inkubierten und ohne die Noxe inkubierten Zellen zu beachten. Alloxan scheint demnach selektiv die Transportfunktion des GLUT2-Glucosetransporters zu inhibieren. Daß der zytotoxische Effekt des Alloxans durch einen Glucosemangel der RINm5F-GLUT2-Zellen durch die Hemmung der GLUT2-Transporterfunktion hervorgerufen wurde, kann aber ausgeschlossen werden, da die Transportkapazität des GLUT1 um ein Vielfaches über dem Bedarf der Zellen lag und durch Alloxan nicht reduziert wurde.

Es gibt noch einen weiteren Hinweis dafür, daß der Verlust der GLUT2-Transportkapazität nicht direkt für die Toxizität des Alloxan verantwortlich ist. Obwohl die Transporterfunktion des GLUT2 bei der gewählten Konzentration von 15 mM Alloxan nahezu vollständig inhibiert war, wurden in den Zytotoxizitätstests annähernd 100 % der Zellen bei dieser Konzentration geschädigt. Hieraus kann geschlossen werden, daß

das GLUT2-Glucosetransporterprotein direkt für die Zytotoxizität des Alloxans verantwortlich war.

Das GLUT2-Transporterprotein könnte an Redoxzyklen des Alloxans wie für das Glutathion beschrieben (Lenzen & Munday 1991; Munday *et al.* 1993) beteiligt sein. Durch Redoxzyklen werden freie Sauerstoffradikale generiert, die z. B. durch Lipidperoxidation eine Zelle schädigen (Halliwell & Gutteridge 1995). Gestützt wird diese Hypothese durch die Befunde von Asayama *et al.* (1984), die nach der Exposition von Alloxan gegenüber pankreatischen Inseln eine im Vergleich zu Erythrozyten erhöhte Konzentration von freien Sauerstoffradikalen messen konnten. In Erythrozyten wird der GLUT2-Glucosetransporter nicht exprimiert (Mueckler 1994).

Aus den Versuchsergebnissen kann zusammenfassend geschlossen werden, daß die Toxizität des Streptozotocins gegenüber GLUT2-überexprimierenden RINm5F-Zellen auf dem Transport der Noxe über den GLUT2-Glucosetransporter in die Zelle beruht, während das GLUT2-Glucosetransporterprotein eine direkte Zielstruktur für die toxische Wirkung des Alloxan zu sein scheint.

5 Zusammenfassung

Die Transplantation von insulinproduzierenden Surrogatzellen könnte eine zukunfts-trächtige Strategie für die Therapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus darstellen. Es war das Ziel der vorliegenden Dissertation, auf der Basis der RINm5F-Gewebe-kulturzelllinie mittels molekularbiologischer Methoden insulinproduzierende Ersatz-zellen zu generieren, die bedarfsgerecht auf Stimulation durch physiologische Glucose-konzentrationen eine adäquate Insulinsekretion zeigen. Das niedrigaffine glucose-phosphorylierende Enzym Glucokinase sowie der niedrigaffine Glucosetransporter GLUT2 koppeln als Glucose-Erkennungsstrukturen Änderungen millimolarer physio-logischer Glucosekonzentrationen an den Metabolismus, der eine Signalfunktion für die Auslösung der Insulinsekretion besitzt. Durch Überexpression der Glucokinase in RINm5F-Zellen mit konstitutiver Expression des GLUT2-Glucosetransporters erlangten die Zellen eine Glucoseresponsivität der Insulinsekretion im physiologischen milli-molaren Konzentrationsbereich mit einem dreifachen Anstieg gegenüber dem basalen Sekretionsniveau. Die Überexpression des GLUT2-Glucosetransporters in RINm5F-Zellen hatte hingegen keinen Einfluß auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion. Nach Implantation der RINm5F-GK-Surrogatzellen in diabetische Ratten war nach einer oralen Glucosebelastung ein signifikanter Anstieg der Seruminsulinkonzentration nachweisbar. Die Glucoseresponsivität der Insulinsekretion und die im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollzellen niedrige basale Sekretionsrate erklären die prolongierte Normalisierung der diabetischen Stoffwechsellage nach Implantation der Zellen. Durch geeignete Mikroverkapselungstechniken, die regulierend auf die Proliferation der Surrogatzellen einwirken und eine Immunisolation gegenüber dem Empfängerorganismus gewährleisten, stellen diese RINm5F-GK-Zellen eine vielversprechende Perspektive für die Therapie des Diabetes mellitus dar.

Die Glucokinase unterliegt in den B-Zellen des Pankreas einer komplexen Regulation, die für die Signalerkennung der Glucose eine entscheidende Rolle spielt. So konnte in der vorliegenden Arbeit an den RINm5F-GK-Zellen gezeigt werden, daß die Gluco-kinase-Enzymaktivität durch die Bindung an einen bislang unbekanntem Proteinfaktor reguliert wird. Dieser Mechanismus der posttranslationalen Regulation der Gluco-kinase-Enzymaktivität in insulinproduzierenden Zellen wurde durch eine selektive

Permeabilisierungstechnik an RINm5F-GK-Zellen mit Digitonin und Triton X-100 charakterisiert. Dabei konnte ein diffusibles Glucokinasekompartiment mit einer hohen spezifischen Enzymaktivität von einem matrixgebundenen Glucokinasekompartiment mit niedriger spezifischer Enzymaktivität unterschieden werden. Durch proteolytischen Verdau und Hitzebehandlung konnte gezeigt werden, daß der Interaktionspartner der Glucokinase ein Protein ist, dem offenbar eine zentrale Rolle bei der Regulation der Glucokinaseaktivität und somit der glucoseinduzierten Insulinsekretion zukommt.

Der Glucosetransporter GLUT2 spielt für die Empfindlichkeit von B-Zellen des Pankreas gegenüber den diabetogenen Substanzen Alloxan und Streptozotocin eine entscheidende Rolle. Diese Substanzen sind seit langem wegen ihrer spezifischen B-Zelltoxizität in der experimentellen Diabetologie etabliert. Aufgrund der sterischen Ähnlichkeit zur Glucose werden Zuckerbindungsstrukturen wie der GLUT2-Glucosetransporter als Ziel- bzw. Transportstrukturen angenommen. RINm5F-Kontrollzellen, die im Vergleich zu normalen B-Zellen keine signifikante Expression des GLUT2-Glucosetransporters zeigten, waren im MTT-Zytotoxizitätsassay unempfindlich gegenüber Alloxan. Im Gegensatz hierzu bewirkte die Überexpression des GLUT2-Glucosetransporters in RINm5F-Zellen eine drastische Erhöhung der Toxizität von Alloxan mit einem IC_{50} -Wert von 10 mM. Glucose schützte GLUT2-überexprimierende Zellen vor der toxischen Wirkung von Alloxan mit einem EC_{50} -Wert von 12 mM. Alloxan hemmte selektiv die Transportfunktion des niedrigaffinen GLUT2-Glucosetransporters. Die Überexpression des GLUT2-Glucosetransporters in RINm5F-Zellen resultierte auch in einer zehnfach erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Streptozotocin mit einem IC_{50} -Wert von 2 mM. Im Unterschied zu Alloxan bewirkte Streptozotocin jedoch keine Hemmung der GLUT2-Transportfunktion in RINm5F-GLUT2-Zellen. Zudem war Glucose nicht in der Lage, RINm5F-GLUT2-Zellen vor der toxischen Wirkung von Streptozotocin zu schützen. Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig die unterschiedliche Bedeutung des GLUT2-Glucosetransporters für die B-Zelltoxizität und Diabetogenität gezeigt werden. Während die erhöhte Empfindlichkeit von RINm5F-GLUT2-Zellen gegenüber Streptozotocin durch eine erhöhte Transportkapazität für die toxische Substanz erklärt werden kann, scheint das GLUT2-Transporterprotein selbst eine wesentliche Zielstruktur für die Alloxantoxizität zu sein.

Die Glucose-Erkennung durch die Glucokinase und den GLUT2-Glucosetransporter beinhaltet somit verschiedene Aspekte, die für die Funktion der pankreatischen B-Zelle von entscheidender Bedeutung sind. Neben der Grundfunktion in der Stimulus-Sekretionskopplung, die eine Generierung von glucoseresponsiven Surrogatzellen für die Gentherapie des Diabetes mellitus ermöglicht, spielt die posttranslationale Regulation der Glucokinase eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der Enzymaktivität und somit dem Erhalt der Glucoseresponsivität der B-Zelle des Pankreas. Das Expressionsniveau des GLUT2-Glucosetransporters ist zudem von entscheidender Bedeutung für die Empfindlichkeit gegenüber den selektiv B-zelltoxischen und diabetogenen Substanzen Alloxan und Streptozotocin.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, V., Bosch, W., Hammerle, T. & Brdiczka, D. (1988).** Activation of low Km hexokinases in purified hepatocytes by binding to mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **932**: 195-205.
- Agius, L. (1994).** Hexokinase and glucokinase binding in permeabilized guinea-pig hepatocytes. *Biochem J* **303**: 841-846.
- Agius, L. & Peak, M. (1993).** Intracellular binding of glucokinase in hepatocytes and translocation by glucose, fructose and insulin. *Biochem J* **296**: 785-796.
- Agius, L., Peak, M. & Van Schaftingen, E. (1995).** The regulatory protein of glucokinase binds to the hepatocyte matrix, but, unlike glucokinase, does not translocate during substrate stimulation. *Biochem J* **309**: 711-713.
- Asayama, K., Nyfeler, F., English, D., Pilkis, S.J. & Burr, I.M. (1984).** Alloxan-induced free radical production in isolated cells. Selective effect on islet cells. *Diabetes* **33**: 1008-1011.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P.A. & Wollheim, C.B. (1992).** Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* **130**: 167-178.
- Bali, D., Svetlanov, A., Lee, H.W., Fuscodemane, D., Leiser, M., Li, B.J., Barzilai, N., Surana, M., Hou, H., Fleischer, N., Depinho, R., Rossetti, L. & Efrat, S. (1995).** Animal model for maturity-onset diabetes of the young generated by disruption of the mouse glucokinase gene. *J Biol Chem* **270**: 21464-21467.
- Becker, T.C., BeltrandelRio, H., Noel, R.J., Johnson, J.H. & Newgard, C.B. (1994).** Overexpression of hexokinase I in isolated islets of Langerhans via recombinant adenovirus. Enhancement of glucose metabolism and insulin secretion at basal but not stimulatory glucose levels. *J Biol Chem* **269**: 21234-21238.
- Bell, G.I., Burant, C.F., Takeda, J. & Gould, G.W. (1993).** Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* **268**: 19161-16164.
- Bell, G.I., Fukumoto, H., Burant, C.F., Seino, S., Sivitz, W.I. & Pessin, J.E. (1991).** Facilitative glucose transport proteins: structure and regulation of expression in adipose tissue. *Int J Obes* **2**: 127-132.
- Bell, G.I., Kayano, T., Buse, J.B., Burant, C.F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H. & Seino, S. (1990).** Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* **13**: 198-208.
- Bennett, R.A. & Pegg, A.E. (1981).** Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res* **41**: 2786-2790.
- Bhathena, S., Oie, H., Gazdar, A., Voyles, N., Wilkins, S. & Recant, L. (1982).** Insulin, glucagon, and somatostatin receptors on cultured cells and clones from rat islet cell tumor. *Diabetes* **31**: 521-531.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Brant, A.M., Jess, T.J., Milligan, G., Brown, C.M. & Gould, G.W. (1993).** Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 1297-1302.

Brdiczka, D. & Wallimann, T. (1994). The importance of the outer mitochondrial compartment in regulation of energy metabolism. *Mol Cell Biochem* **134**: 69-83.

Charles, R.S., Harrison, R.W., Bell, G.I., Pilkis, S.J. & Weber, I.T. (1994). Molecular model of human beta-cell glucokinase built by analogy to the crystal structure of yeast hexokinase B. *Diabetes* **43**: 784-791.

Chen, C., Hosokawa, H., Bumbalo, L.M. & Leahy, J.L. (1994). Regulatory effects of glucose on the catalytic activity and cellular content of glucokinase in the pancreatic beta cell. Study using cultured rat islets. *J Clin Invest* **94**: 1616-1620.

Chen, C., Thorens, B., Bonner Weir, S., Weir, G.C. & Leahy, J.L. (1992). Recovery of glucose-induced insulin secretion in a rat model of NIDDM is not accompanied by return of the B-cell GLUT2 glucose transporter. *Diabetes* **41**: 1320-1327.

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159.

Clark, S., Quaade, C., Constandy, H., Hansen, P., Halban, P., Ferber, S., Newgard, C. & Normington, K. (1997). Novel insulinoma cell lines produced by iterative engineering of GLUT2, glucokinase, and human insulin expression. *Diabetes* **46**: 958-967.

Craven, P.A. & DeRubertis, F.R. (1977). Inhibition by retinol and butylated hydroxyanisole of carcinogen-mediated increases in guanylate cyclase activity and guanosine 3':5'-monophosphate accumulation. *Cancer Res* **37**: 4088-4097.

D'Ambra, R., Surana, M., Efrat, S., Starr, R.G. & Fleischer, N. (1990). Regulation of insulin secretion from beta-cell lines derived from transgenic mice insulinomas resembles that of normal beta-cells. *Endocrinology* **126**: 2815-2822.

Detheux, M., Vandekerckhove, J. & Van Schaftingen, E. (1993). Cloning and sequencing of rat liver cDNAs encoding the regulatory protein of glucokinase. *Febs Lett* **321**: 111-115.

Detheux, M., Vandercammen, A. & Van Schaftingen, E. (1991). Effectors of the regulatory protein acting on liver glucokinase: a kinetic investigation. *Eur J Biochem* **200**: 553-561.

Docherty, K. (1997). Gene therapy for diabetes mellitus. *Clin Sci (Colch)* **92**: 321-30.

Downs, T.R. & Wilfinger, W.W. (1983). Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue. *Anal Biochem* **131**: 538-547.

Efrat, S. (1998). Cell-based therapy for insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* **138**: 129-133.

Efrat, S., Fusco-DeMane, D., Lemberg, H., al Emran, O. & Wang, X. (1995). Conditional transformation of a pancreatic beta-cell line derived from transgenic mice expressing a tetracycline-regulated oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3576-3580.

Efrat, S., Leiser, M., Surana, M., Tal, M., Fusco Demane, D. & Fleischer, N. (1993). Murine insulinoma cell line with normal glucose-regulated insulin secretion. *Diabetes* **42**: 901-907.

Efrat, S., Surana, M. & Fleischer, N. (1991). Glucose induces insulin gene transcription in a murine pancreatic beta-cell line. *J Biol Chem* **266**: 11141-11143.

Efrat, S., Tal, M. & Lodish, H.F. (1994). The pancreatic beta-cell glucose sensor. *Trends Biochem Sci* **19**: 535-538.

- Ferber, S., BeltrandelRio, H., Johnson, J.H., Noel, R.J., Cassidy, L.E., Clark, S., Becker, T.C., Hughes, S.D. & Newgard, C.B. (1994). GLUT-2 gene transfer into insulinoma cells confers both low and high affinity glucose-stimulated insulin release. Relationship to glucokinase activity. *J Biol Chem* **269**: 11523-11529.
- Fleischer, N., Chen, C., Surana, M., Leiser, M., Rossetti, L., Pralong, W. & Efrat, S. (1998). Functional analysis of a conditionally transformed pancreatic beta-cell line. *Diabetes* **47**: 1419-1425.
- Gazdar, A., Chick, W., Oie, H., Sims, H., King, D., Weir, G. & Lauris, V. (1980). Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 3519-3523.
- Grupe, A., Hultgren, B., Ryan, A., Ma, Y.H., Bauer, M. & Stewart, T.A. (1995). Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. *Cell* **83**: 69-78.
- Guillam, M.T., Hummler, E., Schaerer, E., Yeh, J.I., Birnbaum, M.J., Beermann, F., Schmidt, A., Deriaz, N., Thorens, B. & Wu, J.Y. (1997). Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet* **17**: 327-330.
- Halban, P.A., Praz, G.A. & Wollheim, C.B. (1983). Abnormal glucose metabolism accompanies failure of glucose to stimulate insulin release from a rat pancreatic cell line (RINm5F). *Biochem J* **212**: 439-443.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1995) Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford.
- Heimberg, H., De Vos, A., Vandercammen, A., Van Schaftingen, E., Pipeleers, D. & Schuit, F. (1993). Heterogeneity in glucose sensitivity among pancreatic beta-cells is correlated to differences in glucose phosphorylation rather than glucose transport. *Embo J* **12**: 2873-2879.
- Hohmeier, H., BeltrandelRio, H., Clark, S., Henkel-Rieger, R., Normington, K. & Newgard, C. (1997). Regulation of insulin secretion from novel engineered insulinoma cell lines. *Diabetes* **46**: 968-977.
- Hughes, S.D., Johnson, J.H., Quaade, C. & Newgard, C.B. (1992). Engineering of glucose-stimulated insulin secretion and biosynthesis in non-islet cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 688-692.
- Hughes, S.D., Quaade, C., Johnson, J.H., Ferber, S. & Newgard, C.B. (1993). Transfection of AtT-20ins cells with GLUT-2 but not GLUT-1 confers glucose-stimulated insulin secretion. Relationship to glucose metabolism. *J Biol Chem* **268**: 15205-15212.
- Ishihara, H., Asano, T., Tsukuda, K., Katagiri, H., Inukai, K., Anai, M., Kikuchi, M., Yazaki, Y., Miyazaki, J.I. & Oka, Y. (1993a). Overexpression of hexokinase I but not GLUT1 glucose transporter alters concentration dependence of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cell line MIN6. *J Biol Chem* **269**: 3081-3087.
- Ishihara, H., Asano, T., Tsukuda, K., Katagiri, H., Inukai, K., Anai, M., Kikuchi, M., Yazaki, Y., Miyazaki, J.I. & Oka, Y. (1993b). Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* **36**: 1139-1145.
- Iynedjian, P.B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J* **293**: 1-13.
- Iynedjian, P.B., Pilot, P.R., Nospikel, T., Milburn, J.L., Quaade, C., Hughes, S., Ucla, C. & Newgard, C.B. (1989). Differential expression and regulation of the glucokinase gene in liver and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 7838-7842.

- Jetton, T.L., Liang, Y., Pettepher, C.C., Zimmerman, E.C., Cox, F.G., Horvath, K., Matschinsky, F.M. & Magnuson, M.A. (1994).** Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. *J Biol Chem* **269**: 3641-3654.
- Jetton, T.L., Moates, J.M., Lindner, J., Wright, C.V. & Magnuson, M.A. (1998).** Targeted oncogenesis of hormone-negative pancreatic islet progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8654-8659.
- Joannides, R., Richard, V., Haefeli, W.E., Benoist, A., Linder, L., Luscher, T.F. & Thuillez, C. (1997).** Role of nitric oxide in the regulation of the mechanical properties of peripheral conduit arteries in humans. *Hypertension* **30**: 1465-1470.
- Johnson, J.H., Ogawa, A., Chen, L., Orci, L., Newgard, C.B., Alam, T. & Unger, R.H. (1990).** Underexpression of beta cell high Km glucose transporters in noninsulin-dependent diabetes. *Science* **250**: 546-9.
- Jorns, A., Munday, R., Tiedge, M. & Lenzen, S. (1997).** Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro. *J Endocrinol* **155**: 283-293.
- Jorns, A., Tiedge, M., Sickel, E. & Lenzen, S. (1996).** Loss of GLUT2 glucose transporter expression in pancreatic beta cells from diabetic Chinese hamsters. *Virchows Arch* **428**: 177-185.
- Kawakami, Y., Inoue, K., Hayashi, H., Wang, W.J., Setoyama, H., Gu, Y.J., Imamura, M., Iwata, H., Ikada, Y., Nozawa, M. & Miyazaki, J. (1997).** Subcutaneous xenotransplantation of hybrid artificial pancreas encapsulating pancreatic B cell line (MIN6): functional and histological study. *Cell Transplant* **6**: 541-545.
- Kayano, T., Burant, C.F., Fukumoto, H., Gould, G.W., Fan, Y.S., Eddy, R.L., Byers, M.G., Shows, T.B., Seino, S. & Bell, G.I. (1990).** Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J Biol Chem* **265**: 13276-13282.
- Knaack, D., Fiore, D.M., Surana, M., Leiser, M., Laurance, M., Fusco, D.D., Hegre, O.D., Fleischer, N. & Efrat, S. (1994).** Clonal insulinoma cell line that stably maintains correct glucose responsiveness. *Diabetes* **43**: 1413-1417.
- Kroncke, K.D., Fehsel, K., Sommer, A., Rodriguez, M.L. & Kolb-Bachofen, V. (1995).** Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea Streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**: 179-185.
- Lacy, P.E. (1993).** Status of islet cell transplantation. *Diab Rev* **1**: 76-92.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LeDoux, S.P. (1986).** Mechanisms of nitrosourea-induced B-cell damage. *Diabetes* **35**: 866-872.
- Ledoux, S.P. & Wilson, G.L. (1984).** Effects of streptozotocin on a clonal isolate of rat insulinoma cells. *Biochim Biophys Acta* **804**: 387-392.
- Lenzen, S. (1990).** Hexose recognition mechanisms in pancreatic B-cells. *Biochem. Soc. Trans.* **18**: 105-107.

- Lenzen, S. (1992a).** Glucokinase: signal recognition enzyme for glucose-induced insulin secretion. In Flatt, P.R. (ed.) *Nutrient regulation of insulin secretion*. Portland Press, London and Chapel Hill, pp. 101-125.
- Lenzen, S., Brand, F.H. & Panten, U. (1988a).** Structural requirements of alloxan and ninhydrin for glucokinase inhibition and of glucose for protection against inhibition. *Br J Pharmacol* **95**: 851-859.
- Lenzen, S., Freytag, S. & Panten, U. (1988b).** Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in the sugar-binding site of the enzyme. *Mol Pharmacol* **34**: 395-400.
- Lenzen, S., Freytag, S., Panten, U., Flatt, P.R. & Bailey, C.J. (1990).** Alloxan and ninhydrin inhibition of hexokinase from pancreatic islets and tumoural insulin-secreting cells. *Pharmacol Toxicol* **66**: 157-162.
- Lenzen, S. & Munday, R. (1991).** Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol* **42**: 1385-1391.
- Lenzen, S. & Panten, U. (1985).** A versatile Ca^{2+} ion-sensitive minielectrode with a microincubation chamber. *Anal Biochem* **149**: 301-308.
- Lenzen, S. & Panten, U. (1988a).** Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetologia* **31**: 337-342.
- Lenzen, S. & Panten, U. (1988b).** Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochem Pharmacol* **37**: 371-378.
- Lenzen, S. & Tiedge, M. (1994).** Regulation of pancreatic B-cell glucokinase and GLUT2 glucose transporter gene expression. *Biochem Soc Trans* **22**: 1-6.
- Lenzen, S., Tiedge, M., Flatt, P.R., Bailey, C.J. & Panten, U. (1987a).** Defective regulation of glucokinase in rat pancreatic islet cell tumours. *Acta Endocrinol Copenh* **115**: 514-520.
- Lenzen, S., Tiedge, M. & Panten, U. (1987b).** Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinol Copenh* **115**: 21-29.
- Lindl, T. & Bauer, J. (1994).** *Zell- und Gewebekultur. Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- Magnuson, M.A. (1990).** Glucokinase gene structure. Functional implications of molecular genetic studies. *Diabetes* **39**: 523-527.
- Magnuson, M.A., Andreone, T.L., Printz, R.L., Koch, S. & Granner, D.K. (1989).** Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 4838-4842.
- Magnuson, M.A. & Shelton, K.D. (1989).** An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell. *J Biol Chem* **264**: 15936-15942.
- Malaisse, L.F. & Malaisse, W.J. (1988).** Hexose metabolism in pancreatic islets: regulation of mitochondrial hexokinase binding. *Biochem Med Metab Biol* **39**: 80-98.
- Malaisse, W.J., Malaisse Lagae, F., Sener, A. & Pipeleers, D.G. (1982).** Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 927-930.
- Mamujee, S.N., Zhou, D., Wheeler, M.B., Vacek, I. & Sun, A.M. (1997).** Evaluation of immunoisolated insulin-secreting beta TC6-F7 cells as a bioartificial pancreas. *Ann Transplant* **2**: 27-32.

- Masutani, M., Suzuki, H., Kamada, N., Watanabe, M., Ueda, O., Nozaki, T., Jishage, K., Watanabe, T., Sugimoto, T., Nakagama, H., Ochiya, T. & Sugimura, T. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2301-2304.
- Matschinsky, F., Liang, Y., Kesavan, P., Wang, L., Froguel, P., Velho, G., Cohen, D., Permutt, M.A., Tanizawa, Y., Jetton, T.L., Niswender, K. & Magnuson, M.A. (1993). Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *J Clin Invest* **92**: 2092-2098.
- Matschinsky, F.M. (1990). Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* **39**: 647-652.
- Matsuda, T., Noguchi, T., Yamada, K., Takenaka, M. & Tanaka, T. (1990). Regulation of the gene expression of glucokinase and L-type pyruvate kinase in primary cultures of rat hepatocytes by hormones and carbohydrates. *J Biochem Tokyo* **108**: 778-784.
- Meglasson, M.D. & Matschinsky, F.M. (1984). New perspectives on pancreatic islet glucokinase. *Am J Physiol* **246**: E1-13.
- Meglasson, M.D. & Matschinsky, F.M. (1986). Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* **2**: 163-214.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. & Green, M.R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res* **12**: 7035-7056.
- Middleton, R.J. (1990). Hexokinases and glucokinases. *Biochem Soc Trans* **18**: 180-183.
- Miyazaki, J.I., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, J., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y. & Yamamura, K.I. (1990). Establishment of a pancreatic β -cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: Special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* **127**: 126-132.
- Moore, H.P., Walker, M.D., Lee, F. & Kelly, R.B. (1983). Expressing a human proinsulin cDNA in a mouse ACTH-secreting cell. Intracellular storage, proteolytic processing, and secretion on stimulation. *Cell* **35**: 531-538
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.
- Mueckler, M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* **219**: 713-725.
- Munday, R., Ludwig, K. & Lenzen, S. (1993). The relationship between the physicochemical properties and the biological effects of alloxan and several N-alkyl substituted alloxan derivatives. *J Endocrinol* **139**: 153-163.
- Ohneda, M., Johnson, J.H., Inman, L.R., Chen, L., Suzuki, K., Goto, Y., Alam, T., Ravazzola, M., Orci, L. & Unger, R.H. (1993). GLUT2 expression and function in beta-cells of GK rats with NIDDM. Dissociation between reductions in glucose transport and glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* **42**: 1065-1072.
- Ohneda, M., Johnson, J.H., Lee, Y.H., Nagasawa, Y. & Unger, R.H. (1994). Post-GLUT-2 defects in beta-cells of non-insulin-dependent diabetic obese rats. *Am J Physiol* **267**: 968-974.
- Oie, H.K., Gazdar, A.F. & Minna, J.D. (1983). Clonal analysis of insulin and somatostatin secretion and L-dopa decarboxylase expression by a rat islet cell tumor. *Endocrinology* **112**: 1070-1075.

- Orci, L., Ravazzola, M., Baetens, D., Inman, L., Amherdt, M., Peterson, R.G., Newgard, C.B., Johnson, J.H. & Unger, R.H. (1990a). Evidence that down-regulation of beta-cell glucose transporters in non- insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 9953-9957.
- Orci, L., Unger, R.H., Ravazzola, M., Ogawa, A., Komiya, I., Baetens, D., Lodish, H.F. & Thorens, B. (1990b). Reduced beta-cell glucose transporter in new onset diabetic BB rats. *J Clin Invest* **86**: 1615-1622.
- Pieper, A.A., Brat, D.J., Krug, D.K., Watkins, C.C., Gupta, A., Blackshaw, S., Verma, A., Wang, Z.Q. & Snyder, S.H. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3059-3064.
- Poitout, V., Olson, L.K. & Robertson, R.P. (1996). Insulin-secreting cell lines: Classification, characteristics and potential applications. *Diabetes Metab* **22**: 7-14.
- Praz, G.A., Halban, P.A., Wollheim, C.B., Blondel, B., Strauss, A.J. & Renold, A.E. (1983). Regulation of immunoreactive-insulin release from a rat cell line (RINm5F). *Biochem J* **210**: 345-352.
- Printz, R.L., Magnuson, M.A. & Granner, D.K. (1993). Mammalian glucokinase. *Annu Rev Nutr* **13**: 463-496.
- Rakieten, N., Rakieten, M.L. & Nadkarni, M.V. (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother Rep* **29**: 91-98.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Schnedl, W.J., Ferber, S., Johnson, J.H. & Newgard, C.B. (1994). STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2- expressing cells. *Diabetes* **43**: 1326-33.
- Stewart, C., Taylor, N.A., Green, I.C., Docherty, K. & Bailey, C.J. (1994). Insulin-releasing pituitary cells as a model for somatic cell gene therapy in diabetes mellitus. *J Endocrinol* **142**: 339-343.
- Sutherland, D.E.R. (1993). Pancreatic transplantation. An update. *Diabetes Reviews* **1**: 152-165.
- Takeda, J., Gidh Jain, M., Xu, L.Z., Froguel, P., Velho, G., Vaxillaire, M., Cohen, D., Shimada, F., Makino, H., Nishi, S. & et al. (1993). Structure/function studies of human beta-cell glucokinase. Enzymatic properties of a sequence polymorphism, mutations associated with diabetes, and other site-directed mutants. *J Biol Chem* **268**: 15200-15204.
- Tal, M., Liang, Y., Najafi, H., Lodish, H.F. & Matschinsky, F.M. (1992). Expression and function of GLUT-1 and GLUT-2 glucose transporter isoforms in cells of cultured rat pancreatic islets. *J Biol Chem* **267**: 17241-17247.
- Thomas, H.M., Brant, A.M., Colville, C.A., Seatter, M.J. & Gould, G.W. (1992). Tissue-specific expression of facilitative glucose transporters: a rationale. *Biochem Soc Trans* **20**: 538-542.
- Thorens, B. (1992). Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol* **137**: 209-238.
- Thorens, B., Charron, M.J. & Lodish, H.F. (1990a). Molecular physiology of glucose transporters. *Diabetes Care* **13**: 209-218.

- Thorens, B., Cheng, Z.Q., Brown, D. & Lodish, H.F. (1990b).** Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney. *Am J Physiol* **259**: 279-285.
- Thorens, B. & Roduit, R. (1994).** Regulated expression of GLUT2 in diabetes studied in transplanted pancreatic beta cells. *Biochem Soc Trans* **22**: 684-687.
- Thorens, B., Sarkar, H.K., Kaback, H.R. & Lodish, H.F. (1988).** Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* **55**: 281-290.
- Thorens, B., Wu, Y.J., Leahy, J.L. & Weir, G.C. (1992).** The loss of GLUT2 expression by glucose-unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. *J Clin Invest* **90**: 77-85.
- Tiedge, M., Hohne, M. & Lenzen, S. (1993a).** Insulin secretion, insulin content and glucose phosphorylation in RINm5F insulinoma cells after transfection with human GLUT2 glucose- transporter cDNA. *Biochem J* **296**: 113-118.
- Tiedge, M., Krug, U. & Lenzen, S. (1997).** Modulation of human glucokinase intrinsic activity by SH reagents mirrors post-translational regulation of enzyme activity. *Biochim-Biophys-Acta* **1337**: 175-190.
- Tiedge, M. & Lenzen, S. (1991).** Regulation of glucokinase and GLUT-2 glucose-transporter gene expression in pancreatic B-cells. *Biochem J* **279**: 899-901.
- Tiedge, M. & Lenzen, S. (1995).** Effects of glucose refeeding and glibenclamide treatment on glucokinase and GLUT2 gene expression in pancreatic B- cells and liver from rats. *Biochem J* **308**: 139-144.
- Tomita, T., Lacy, P.E., Natschinsky, F.M. & McDaniel, M.L. (1974).** Effect of alloxan on insulin secretion in isolated rat islets perfused in vitro. *Diabetes* **23**: 517-524.
- Toyoda, Y., Miwa, I., Kamiya, M., Ogiso, S., Nonogaki, T., Aoki, S. & Okuda, J. (1994).** Evidence for glucokinase translocation by glucose in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 252-256.
- Toyoda, Y., Miwa, I., Kamiya, M., Ogiso, S., Okuda, J. & Nonogaki, T. (1995a).** Changes in subcellular and zonal distribution of glucokinase in rat liver during postnatal development. *FEBS Lett* **359**: 81-84.
- Toyoda, Y., Miwa, I., Satake, S., Anai, M. & Oka, Y. (1995b).** Nuclear location of the regulatory protein of glucokinase in rat liver and translocation of the regulator to the cytoplasm in response to high glucose. *Biochem Biophys Res Commun* **215**: 467-473.
- Turk, J., Corbett, J.A., Ramanadham, S., Bohrer, A. & McDaniel, M.L. (1993).** Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* **197**: 1458-1464.
- Unger, R.H. (1991).** Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science* **251**: 1200-1205.
- Van Schaftingen, E. (1989a).** A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1- phosphate. *Eur J Biochem* **179**: 179-184.
- Van Schaftingen, E. (1993).** Glycolysis revisited. *Diabetologia* **36**: 581-588.

- Van Schaftingen, E. (1995).** Glucosamine-sensitive and -insensitive detritiation of [2-3H]-Glucose in isolated rat hepatocytes: a study of the contributions of glucokinase and glucose-6-phosphatase. *Biochem J* **308**: 23-29.
- Van Schaftingen, E., Detheux, M. & Veiga da Cunha, M. (1994).** Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *Faseb J* **8**: 414-419.
- van Schaftingen, E., Vandercammen, A., Detheux, M. & Davies, D.R. (1992).** The regulatory protein of liver glucokinase. *Adv Enzyme Regul* **32**: 133-148.
- Vandercammen, A., Detheux, M. & Van Schaftingen, E. (1992).** Binding of sorbitol 6-phosphate and of fructose 1-phosphate to the regulatory protein of liver glucokinase. *Biochem J* **286**: 253-256.
- Vandercammen, A. & Van Schaftingen, E. (1990).** The mechanism by which rat liver glucokinase is inhibited by the regulatory protein. *Eur J Biochem* **191**: 483-489.
- Vandercammen, A. & Van Schaftingen, E. (1991).** Competitive inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein. *Eur J Biochem* **200**: 545-551.
- Varva, J.J., DeBoer, C. & Dietz, A. (1959).** Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot Ann*: 230-235.
- Vesely, D.L. & Levey, G.S. (1977).** Ethanol-induced inhibition of guanylate cyclase in liver, pancreas, stomach and intestine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **17**: 215-224.
- Vesely, D.L. & Levey, G.S. (1978).** The effect of streptozotocin analogues on guanylate cyclase activity. *Horm Metab Res* **10**: 392-395.
- Waldhäusl, W. & Lenzen, S. (1997)** Kohlenhydrate. In Wick, G., Schwarz, S., Peterlik, M., Förster, O. and Schauenstein (eds.), *Pathophysiologie. Molekulare und zelluläre Pathomechanismen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Weiss, R.B. (1982).** Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat Rep* **66**: 427-438.
- White, B.A. (ed.) (1993)** *PCR protocols: current methods and applications*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- White, F.R. (1963).** Streptozotocin. *Cancer Chemother Rep* **30**: 49-53.
- Wilson, V.L., Basu, A.K., Essigmann, J.M., Smith, R.A. & Harris, C.C. (1988).** O6-alkyldeoxyguanosine detection by 32P-postlabeling and nucleotide chromatographic analysis. *Cancer Res* **48**: 2156-2161.
- Yamamoto, H., Uchigata, Y. & Okamoto, H. (1981).** DNA strand breaks in pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocin. *Biochem Biophys Res Commun* **103**: 1014-1020.

Die vorliegende Dissertation wurde im Februar 1996 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. S. Lenzen am Institut für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule begonnen und im Januar 1999 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. S. Lenzen

danke ich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die vielen wertvollen Gespräche, seine hilfreiche Unterstützung und sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. S. Lenzen für das mir entgegengebrachte Vertrauen und sein außerordentliches Engagement im Laufe der Dissertation.

Herrn PD Dr. W. Müller,

danke ich für die Übernahme des Referates und die wertvollen Informationen zum Ablauf des Promotionsverfahrens.

Herrn Dr. M. Tiedge

danke ich für die sehr gute Betreuung, für seine Hilfe bei den vielen Fragen der Konzeption und Durchführung der Versuche sowie bei der Publikation der Ergebnisse. Seine stetige Diskussionsbereitschaft hat einen großen Anteil zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Allen Doktoranden, Mitarbeitern und Gästen des Institutes für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft während der Durchführung der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Oscar Alcazar, Simone Baltrusch, und Stephan Lortz sowie Maren Böger, Anke Hager, Dagmar Lischke, Britta Lueken, Anne Petzold, Ute Sommerfeld, Daniela Tuka und Martin Wirth.

Meiner Frau Christina danke ich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit.

Wissenschaftliche Publikationen:

Tiedge, M.; Krug, U.; Elsner, M.; Lenzen, S. (1995). Kinetische Charakterisierung und Mutationsanalysen der rekombinant exprimierten humanen Glukokinase der B-Zelle des Pankreas und der Leber. *Diabetes und Stoffwechsel* **4**: 213.

Tiedge, M.; Krug, U.; Elsner, M.; Lenzen, S. (1995). Kinetic characteristics and mutation analysis of recombinant human glucokinase. *Diabetologia* **38**: Suppl 1, A28.

Elsner, M.; Tiedge, M.; Lenzen, S. (1997). Glucose-Responsivität der Insulinsekretion von Glucokinase-transfizierten RINm5F-Zellen. *Diabetes und Stoffwechsel* **6**: Suppl 1, 128.

McClenaghan, N.H.; Elsner, M.; Tiedge, M.; Lenzen, S. (1998). Molecular characterization of the glucose-sensing mechanism in the clonal insulin-secreting BRIN-BD11 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **242**: 262-266.

Elsner, M.; Tiedge, M.; McClenaghan, N.H.; Lenzen, S. (1998). Bioengineering glucoseresponsiver insulinsezernierender RINm5F Surrogatzellen zur Verbesserung einer diabetischen Stoffwechsellage durch Implantation. *Diabetes und Stoffwechsel* **7**: Suppl 1, 42.

Lenzen, S.; Tiedge, M.; Lortz, S.; Elsner, M.; Jörns, A.; Klöppel, G.; Wedekind, D.; Prokop, C.; Hedrich, H-J. (1998). The LEW.1AR1/Ztm-*iddm* rat - A new IDDM rat model. *Diabetologia* **41**: Suppl 1, A62.

Elsner, M.; Tiedge, M.; McClenaghan, N.H.; Lenzen, S. (1998). Bioengineering of glucose-responsive insulin-secreting surrogate cells. *Diabetologia* **41**: Suppl 1, A131.

Tiedge, M.; Elsner, M.; Lenzen, S. (1998). Regulation of pancreatic β cell glucokinase activity by a glucose-sensitive protein factor. *Diabetologia* **41**: Suppl 1, A145.

Tiedge, M.; Steffek, H.; Elsner, M.; Lenzen, S. (1999). Metabolic regulation, activity state and intracellular binding of glucokinase in insulin-secreting cells. *Diabetes* **48**: 514-523.

Tiedge, M.; Elsner, M.; McClenaghan, N.H.; Hedrich, H-J; Grube, D.; Klempnauer, J.; Lenzen, S. (2000). Engineering of a glucose-responsive cell for insulin replacement therapy of experimental insulin-dependent diabetes. *Human Gene Therapy* **11**: 403-414.

Elsner, M.; Guldbakke, B.; Tiedge, M.; Munday, R.; Lenzen, S. (2000). Relative Importance of Transport and Alkylation for Pancreatic Beta Cell Toxicity of Streptozotocin. *Diabetes* (zur Publikation eingereicht).

Lenzen, S.; Tiedge, M.; Lortz, S.; Elsner, M.; Jörns, A.; Klöppel, G.; Wedekind, D.; Prokop, C.; Hedrich, H-J. (2000). The LEW.1AR1/Ztm-*iddm* rat - A new IDDM rat model. *Diabetes* (zur Publikation eingereicht).

Lebenslauf

Angaben zur Person

Matthias Elsner

Hertzstraße 6

30163 Hannover

Geburtsdatum: 18.09.1966

Geburtsort: Cloppenburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1973 - 1977

Grundschule Martinus-Schule, Bramsche

1977 - 1978

Orientierungsstufe Innenstadt, Bramsche

1978 - 1979

Don Bosco Orientierungsstufe, Cloppenburg

1979 - 1986

Clemens-August-Gymnasium, Cloppenburg

1986

Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

1986 - 1988

Zivildienst als Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz, Cloppenburg

Studium

1988 - 1989

Elektrotechnikstudium an der Universität Hannover

1989 - 1995

Studium des Lehramtes an Gymnasien für die Fächer Biologie und Chemie

1995

Erstes Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien

Promotion

seit 1996

Promotion am Institut für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover bei Prof. Dr. S. Lenzen

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig unter Angabe aller Hilfsmittel verfaßt habe. Die vorliegende Dissertation ist nicht schon als Diplomarbeit oder vergleichbare Arbeit verwendet worden.

Hannover, den 26.04.2000

Matthias Elsner