

Aus der Medizinischen Fakultät
Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Charakterisierung der Ektonukleotidpyrophosphatase/
Phosphodiesterase 1 und Fructose-1,6-bisphosphatase 1
als CK2-abhängige Zielmoleküle

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von: Tim Nikolai Gulde
geb. am: 09. Mai 1996 in Hechingen

Tag der Promotion: 10. Januar 2023

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Claudia Götz

Prof. Dr. Barbara Anne Niemeyer-Hoth

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1 Zusammenfassung.....	10
1.1 Summary.....	11
2 Einleitung.....	12
2.1 Das Pankreas und dessen glucosestimulierte Insulinsekretion.....	12
2.2 Die Proteinkinase CK2.....	14
2.3 ENPP1 und FBP1.....	15
2.4 Zielsetzung der Arbeit.....	17
3 Materialien.....	18
3.1 Chemikalien und Enzyme.....	18
3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	20
3.3 Antikörper.....	22
3.3.1 Primärantikörper.....	22
3.3.2 Sekundärantikörper.....	23
3.4 Zellsysteme.....	24
3.5 qRT-PCR Primer.....	24
3.6 Experimentelle Kits.....	25
3.7 Puffer und Lösungen.....	25
4 Methoden.....	29
4.1 Molekularbiologische Methoden.....	29
4.1.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
4.1.2 RNA-Extraktion.....	29
4.1.3 Primerdesign.....	30

4.1.4	Reverse Transkription und Quantitative Real-Time-PCR.....	31
4.2	Zellkulturtechniken	33
4.2.1	Kultivieren von Zellen	33
4.2.2	Passagieren von Zellen.....	33
4.2.3	Tauen von Zellen	33
4.2.4	Einfrieren von Zellen	34
4.2.5	Ernten von Zellen	34
4.2.6	Behandlung von Zellen.....	34
4.2.7	Transfektion von Zellen	35
4.3	Proteinanalysen und immunologische Arbeitsmethoden	35
4.3.1	Herstellung von Zelllysaten für Proteinanalysen	35
4.3.2	Proteinquantifizierung nach Bradford	36
4.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
4.3.4	Western-Blot und Immundetektion	37
4.3.5	<i>In vitro</i> -CK2-Kinaseaktivitätsmessung.....	38
4.3.6	Glucose-Biolumineszenz-Assay	39
5	Ergebnisse	41
5.1	Etablierung des geeigneten Modellsystems	41
5.2	Primerdesign für qRT-PCR von ENPP1 und FBP1	42
5.3	mRNA-Expression von ENPP1 und FBP1 nach CK2-Hemmung in INS-1 832/13 ..	45
5.4	Proteinnachweis von ENPP1 und FBP1 in INS-1 832/13	48
5.5	Etablierung eines neuen Modellsystems	50
5.6	Biochemischer Nachweis der CK2-Untereinheiten in McA-RH7777	50
5.7	Bestimmung der CK2-Kinaseaktivität nach Hemmung	51
5.8	Überprüfung der CK2-Hemmstoffbedingungen für McA-RH7777	52
5.9	mRNA-Expression von ENPP1 und FBP1 nach CK2-Hemmung in McA-RH7777 ..	54
5.10	Proteinnachweis von ENPP1 und FBP1 in McA-RH7777	57
5.11	Knock-down der Proteinkinase CK2	59
5.12	Nachweis von Gluconeogenese anhand von Glucoseneubildung.....	62
6	Diskussion.....	66

7	Literaturverzeichnis	73
8	Danksagung	81
9	Lebenslauf.....	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Reaktionsschritt der FBP1 innerhalb der Gluconeogenese	16
Abbildung 2 Aufbau Tank-Blot-System	37
Abbildung 3 Schema Glucose Biolumineszenz entsprechend verwendetem Glucose-Glo™ Assay von Promega	39
Abbildung 4 Zusammensetzung eines Ansatz des Glucose-Glo™ Assay	40
Abbildung 5 Hellfeldaufnahme INS-1 832/13-Zellen in 200x Vergrößerung	41
Abbildung 6 Schmelzkurve für ENPP1	42
Abbildung 7 Schmelzkurve für FBP1-1	43
Abbildung 8 Schmelzkurve für FBP1-2	44
Abbildung 9 Schmelzkurve für FBP1-3	45
Abbildung 10 Amplifikationskurve für ENPP1	46
Abbildung 11 Amplifikationskurve für FBP1	47
Abbildung 12 qRT-PCR Ergebnisse zum mRNA-Gehalt der Zielgene ENPP1 und FBP1	48
Abbildung 13 Western Blot-Analyse zur Expression von ENPP1 und FBP1 in INS-1 832/1349	
Abbildung 14 McA-RH7777 Hellfeldaufnahme bei 200x Vergrößerung.....	50
Abbildung 15 Western Blot Analyse zum Nachweis der CK2-Untereinheiten in McA-RH7777	51
Abbildung 16 In vitro CK2-Kinaseaktivitätsanalyse der CK2-Aktivität in McA-RH7777 nach Hemmung mit CX-4945	52
Abbildung 17 Quantifizierung der Zytolyse mittels Cytotoxicity Detection Kit	53
Abbildung 18 Quantifizierung der Zellproliferation und Zellviabilität mittels WST-1 Testung	54
Abbildung 19 Amplifikationskurve für ENPP1	55
Abbildung 20 Amplifikationskurve für FBP1	56
Abbildung 21 Western Blot Analyse zur Expression von ENPP1 in McA-RH7777 nach Behandlung mit CX-4945	57
Abbildung 22 Western Blot Analyse zur Expression von FBP1 in McA-RH7777- und MCF-7-Zellen	58
Abbildung 23 Western Blot Analyse zur Expression von FBP1 in gluconeogenetisch optimierten McA-RH7777	59
Abbildung 24 Western Blot Analyse zur Expression von CK2 α/α' in McA-RH7777 nach Transfektion	60
Abbildung 25 8 In vitro CK2-Kinaseaktivitätsmessung zur Analyse der CK2-Aktivität in McA-RH7777 nach Transfektion mit siRNA	61
Abbildung 26 Western Blot Analyse zur Expression von FBP1 in McA-RH7777 nach Transfektion mit CK2 siRNA.....	62

Abbildung 27 Glucosemessungen in McA-RH7777 nach Behandlung mit 10 μ M CX-4945/DMSO für 24h	63
Abbildung 28 Extrazelluläre Glucosebestimmung in McA-RH7777 nach Behandlung mit CX-4945/DMSO für 24 h	64
Abbildung 29 Messung der extrazellulären Glucose von McA-RH7777 nach Transfektion mit siRNA CK2 α/α'	65
Abbildung 30 Vereinfachte schematische Darstellung der glucosestimulierten Insulinsekretion in β -Zellen	66
Abbildung 31 Schematische Darstellung ausgewählter CK2-abhängiger Signalwege	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Kits.....	25
Tabelle 2	Puffer für Agarosegelelektrophorese.....	25
Tabelle 3	Stocklösungen und Medien für Zellkulturen.....	25
Tabelle 4	Stocklösungen und Puffer für Proteinextraktion	26
Tabelle 5	Stocklösungen und Puffer für SDS-Polyacrylamidelektrophoresen	26
Tabelle 6	Puffer für Western Blot und Proteindetektion	27
Tabelle 7	Puffer für CK2-in vitro-Kinaseassay	27
Tabelle 8	qRT-PCR Zusammensetzung	32
Tabelle 9	qRT-PCR Schema	32
Tabelle 10	Zusammensetzung der Trenngele und des Sammelgels für SDS-PAGE	37
Tabelle 11	qRT-PCR Ergebnisse zum Fold Down von ENPP1 und FBP1 in INS-1 832/13...47	
Tabelle 12	qRT-PCR Ergebnisse zum Fold Down von ENPP1 und FBP1 in McA-RH7777 ..56	

Abkürzungsverzeichnis

λ	Absorption
ADP	Adenosin-Diphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CK2	Proteinkinase (Casein Kinase) CK2
cm	Zentimeter
cpm	<i>counts per minute</i> (Zählimpulse pro Minute)
CT	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert)
C-Terminus	Carboxyterminus
CX-4945	Silmitasertib
deion.	deionisiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E</i>	Extinktion
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötale Kälberserum)
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KRP	Krebs-Ringer-Puffer
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
μ	micro
m	milli
M	molar
mA	Milliampere
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
n	nano
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoternus
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PBST	PBS mit 0.1% (v/v) Tween 20
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR

RLU	relative light units (relative Lichteinheiten)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	Small interfering RNA
Ta	Annealing-/Anlagerungstemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-DNA-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-buffered saline
TBST	TBS mit 0.1% (v/v) Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tetr	Tetracyclinresistenz
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung eines normwertigen Blutzuckerspiegels wird im menschlichen Körper durch ein komplexes Netzwerk aus Hormonen und Neuropeptiden gesteuert. Eine zentrale Rolle der Glucosehomöostase spielen dabei die pankreatischen β -Zellen als Ort der Insulinbiosynthese. In diesen Signalweg greift nach derzeitigem Wissenstand die hochkonservierte und ubiquitär exprimierte Serin-/Threonin-Proteinkinase CK2 mit einem negativen Effekt auf die Insulinexpression ein. Als tetrameres Enzym, bestehend aus zwei katalytischen (α , α') und zwei regulatorischen (β) Untereinheiten, reguliert sie u.a. Pdx1 als zentralen Transkriptionsfaktor der Insulinexpression.

In einem von Michelle Völcker durchgeführten qRT-PCR-Array mit 84 Diabetes-assoziierten Genen zeigten die Ektonukleotidpyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 (ENPP1) und Fructose-1,6-Bisphosphatase 1 (FBP1) jeweils eine mindestens um den Faktor 3 erniedrigte Genexpression nach Hemmung der CK2-Aktivität. Im Zellmodell pankreatischer Ratten-Insulinomzellen INS-1/832 13 und Ratten-Hepatomzellen McA-RH7777 sollte die mögliche CK2-Abhängigkeit der Expression von ENPP1 und FBP1 untersucht werden.

In den Zellen wurde die CK2 dabei einerseits durch den Inhibitor CX-4945 und mittels Transfektion gehemmt. Die in der qRT-PCR erhobenen Ergebnisse zeigten für ENPP1 eine 2.47-, bzw. für FBP1 eine 1.92-fache Herunterregulation der mRNA-Expression. Die Ergebnisse wurden auf Proteinebene untersucht, wobei die Proben von ENPP1 eine 0.67-fache Herunterregulation ergaben. Für FBP1, als ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese, war ein Nachweis des Proteins nicht möglich, daher erfolgte der indirekte Nachweis über eine Messung der Glucoseneubildung. Dabei konnte in transfizierten McA-RH7777-Zellen nach Hemmung der CK2-Kinaseaktivität eine auf etwa 63% reduzierte Sekretion von Glucose ermittelt werden. Das Wissen einer CK2-abhängigen Regulation der FBP1 dient dabei als Erweiterung der Kenntnis des CK2-abhängigen Netzwerks. Die Inhibition der CK2 könnte dabei ein weiterer Baustein in der Therapie insulinabhängiger Erkrankungen darstellen.

1.1 Summary

The maintenance of a normal blood sugar level is controlled in the human body by a complex network of hormones and neuropeptides. Pancreatic β -cells play a central role in glucose homeostasis as the place of insulin biosynthesis. According to the current knowledge, the highly conserved and ubiquitously expressed serine/threonine protein kinase CK2 intervenes in this signal pathway, with a negative effect on insulin expression. As a heterotetramer composed of two catalytic (α , α') and two regulatory (β) subunits, it modulates Pdx1 as the central transcription factor of insulin expression.

In a qRT-PCR array carried out by Michelle Völcker with 84 diabetes-associated genes, ectonucleotidetriphosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) and fructose-1,6-bisphosphatase 1 (FBP1) each showed a gene expression that was at least 3 times lower.

Within this dissertation, pancreatic rat insulinoma cells INS-1/832 13 and rat hepatoma cells McA-RH7777 were used to describe effects of a CK2 inhibition to ENPP1 and FBP1 as possible CK2-dependent targets. In addition a possible influence on protein expression was investigated.

An inhibition of the CK2 kinase activity was achieved with the inhibitor CX-4945 and by transfection. The results obtained in the qRT-PCR showed a 2.47-fold for FBP1 and 1.92-fold down regulation of the gene expression for ENPP1. The collected data was confirmed at the protein level, with the ENPP1 samples showing a 0.67-fold down regulation. For FBP1, a key enzyme in gluconeogenesis, it was possible to determine a secretion of glucose reduced to about 63% in transfected McA-RH7777 cells after inhibition of the CK2 kinase activity.

CK2-dependent regulation of FBP1 serves as an extension of the knowledge of the CK2-based network. Inhibition of CK2 could represent a further option in the therapy of insulin-dependent diseases.

2 Einleitung

2.1 Das Pankreas und dessen glucosestimulierte Insulinsekretion

Das Pankreas ist ein gemischt exokrines und endokrines Drüsenorgan im Oberbauch und entscheidend am Verdauungsprozess beteiligt [9].

Die exokrinen Azinuszellen sezernieren den zur Verdauung notwendigen Pankreassaft, welcher sich aus verschiedenen Enzymen, wie Amylasen, Proteasen und Lipasen zusammensetzt [85]. Über Schaltstücke vereinigen sich die Azini in immer größer werdende Ausführungsgänge und enden schließlich als Ductus pancreaticus major oder minor im Duodenum [9].

Der endokrine Anteil der Bauchspeicheldrüse ist als Langerhans-Inseln organisiert und in mehrere Zelltypen zu unterscheiden. Deren Aufgabe ist die Synthese und Sekretion der Pankreashormone in den Blutkreislauf [53]. Der dominierende Zelltyp der Inseln sind insulinproduzierende β -Zellen mit einem Anteil von ungefähr 70%. Es folgen mit ca. 20% α -Zellen, welche Glucagon synthetisieren. Bis zu 10% entfallen auf Somatostatin-produzierende δ -Zellen, 3-5% sind γ -Zellen und bilden das Pankreas-Polypeptid. Weniger als 1% der Inselzellen sind Ghrelin-produzierende ϵ -Zellen [85].

Durch ein Wechselspiel von Insulin und Glucagon hält das Pankreas den Plasmaglucosespiegel in einem physiologischen Bereich von 4 bis 6 mmol/l. Dieser Zustand wird als Glucosehomöostase bezeichnet [44].

Kommt es nun über die Nahrungsaufnahme zu einem exogenen Glucosereiz, wird Insulin im Rahmen der glucosestimulierten Insulinsekretion aus den β -Zellen ins Blut ausgeschüttet. Nach dem Andocken an entsprechenden Zielgewebe kann Muskel- und auch Fettgewebe Glucose insulinabhängig aufnehmen und dadurch den Blutzuckerwert senken [85].

Zur Induktion der Insulinsekretion wird die im Blut zirkulierende Glucose über den GLUT1 in die β -Zellen aufgenommen und glykolytisch verwertet [52]. Hierzu wird die Glucose mittels Glucokinase zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert und der Glykolyse zugeführt [15]. An deren Ende steht Pyruvat, welches über den Citratzyklus und die Atmungskette zu einem zytosolischen Anstieg der Konzentration von ATP führt [98]. Die Veränderung des ATP/ADP-Verhältnisses bewirkt das Verschließen von ATP-sensitiven K^+ -Kanälen und damit eine Depolarisation der Membran. Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle öffnen und es kommt zum Ca^{2+} -Einstrom und Exozytose der insulinhaltigen Granula [52,85]. Parallel zur Insulinfreisetzung kommt es zur Hochregulation der Proinsulin-Biosynthese und damit zum Auffüllen der Insulinspeicher in den β -Zellen [15].

Über die Blutbahn gelangt Insulin in die Leber, Muskel- oder Fettgewebe. Die Passage der Leber reguliert dabei den Transport in die Peripherie, weshalb sie eine deutlich höhere Insulinkonzentration aufweist [98]. Im Zielgewebe führt die Bindung des Insulin an den entsprechenden Tyrosinkinase-Rezeptor zur Autophosphorylierung des Rezeptors [52]. Die Aktivierung der Kinase ermöglicht die Rekrutierung von intrazellulären Proteinen, wie das Insulinrezeptorsubstrat (IRS), welches die Basis der folgenden Signaltransduktion darstellt [18]. Dadurch wird im Zielgewebe die Glucoseresorption über den Einbau von GLUT4 deutlich erhöht, Glykogenspeicher angelegt bzw. die Glykolyse gefördert [52].

Kommt es zu Komplikationen bei der Insulinsekretion oder -resorption, drohen unbehandelt Krankheitsbilder mit schwerwiegenden Folgen wie Retinopathie, Nephropathie und vaskuläre Erkrankungen [3,36].

Bei Diabetes mellitus I (T1DM) führen genetischen Faktoren, aber auch Umwelteinflüsse, zur autoimmunen Zerstörung der pankreatischen β -Zellen und damit zum absoluten Insulinmangel [36,87].

Patienten mit genetischem Risikoprofil im Hinblick auf die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ I (T1DM) neigen zur Bildung von β -Zell-Autoantikörpern. Diese Störung in der Immunregulation führt letztendlich zur Zerstörung der β -Zellen [78]. Die Erkrankung weist Assoziationen mit dem humanen Leukozytenantigen, kurz HLA, auf [103]. Dabei können die an der Antigen-Präsentation beteiligten HLA-Haplotypen das Risiko einer Erkrankung erhöhen, jedoch auch vorbeugend wirken [25,78]. Weitere, in genomweiten Assoziationsstudien erfasste, nicht-HLA-assoziierte Gene sind mehrheitlich an der Immunfunktion und -regulation beteiligt [103].

Eckpfeiler der Therapie des absoluten Insulinmangels bei einem T1DM ist immer noch die Substitution von Insulin und dessen Analoga, wobei die Imitation einer möglichst physiologischen Freisetzung angestrebt wird [8,25]. Durch weitere identifizierte Gene, die an der Pathogenese eines T1DM beteiligt sind, eröffnen sich neue Ansätze für die Therapie [10,22]. Eine Veränderung ursächlicher Gene und die Regulation einzelner Proteine könnten zu einem ganzheitlicherem Krankheitsmanagement beitragen [4,22]. Aufgrund ihrer Beteiligung an der Insulinexpression und zur Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase ist die Proteinkinase CK2 als eines der möglichen Ziele in Betracht zu ziehen [2,92].

Häufiger zeigt sich ein Diabetes mellitus II (T2DM), bedingt durch eine Insulinresistenz. Initial kann es zum Kompensationsversuch durch Hypersekretion des Insulins kommen, dem ein Rückgang der Insulinfreisetzung nach Dekompensation folgt [36].

2.2 Die Proteinkinase CK2

Bei der Proteinkinase CK2, früher als Casein-Kinase 2 bezeichnet, handelt es sich um eine ubiquitär vorkommende, hochkonservierte Serin / Threonin-Kinase [66]. Das Holoenzym liegt zumeist als Tetramer vor und besteht aus zwei katalytischen CK2 α - oder CK2 α' -Untereinheiten sowie zwei funktionellen CK2 β -Untereinheiten [38]. Die Untereinheiten werden dabei von verschiedenen Genen codiert und weisen vom Holoenzym abweichende biochemische Eigenschaften auf [16,61]. In ihrer Funktion als Kinase phosphoryliert sie einige hundert Substrate und ist dadurch entscheidend für physiologische Vorgänge der Zelle und deren Überleben [1,17]. Während der embryonalen Entwicklung ist die CK2 bedeutend, was ein Anstieg der CK2-Aktivität bis zum 12. Tag der Embryogenese von Mäusen zeigt [40]. In Abwesenheit von CK2 α oder CK2 β versterben Mäuse während der Embryogenese u.a. an kardialen Anomalien [68]. In etwa ein Drittel der CK2-Substrate sind an Proteinbiosynthese und Genexpression beteiligt. Nur ein Bruchteil der Substrate sind Stoffwechsellzyme [62]. Auch an der Regulation von Entzündungsreaktionen ist die CK2 über Wechselwirkungen mit von der Immunabwehr genutzten Signalwegen beteiligt [38]. So wurde kürzlich eine Korrelation der CK2 mit einer SARS-CoV-2-Infektion untersucht [39]. Durch den überwiegenden Einfluss auf Zellproliferation sowie das Einhalten der Apoptose ist in vielen proliferationsaktiven Geweben, einschließlich Krebszellen, eine erhöhte Kinaseaktivität vorzufinden [17,75]. Hierbei kommt die regulierende Wirkung der CK2 auf verschiedene Signalwege innerhalb der Pathogenese von Karzinomen zum Tragen [91]. So trägt die Regulation von NF- κ B und des Wnt-Signalwegs sowie weiterer Signalkaskaden zur Tumorentstehung bei [27]. Die Wnt-Signaltransduktion wird dabei aktiviert, so dass die Phosphorylierung des Transkriptions-Co-Faktors β -Catenin zu dessen Hochregulation führt [26].

Doch auch das Wissen über die Wechselwirkungen der CK2 mit grundlegenden Stoffwechselfunktionen wächst zunehmend. So ist eine hormonelle Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels durch CK2 bekannt [2].

Rui Meng zeigte, dass die CK2 das duodenale Homöobox-1-Protein Pdx-1 an den Aminosäuren Serin 232 und Threonin 231 phosphoryliert und die Transkriptionsaktivität von Pdx-1 reguliert [74]. Zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie USF1 und USF2 ist Pdx-1 an der Insulinsynthese beteiligt [92]. Die spezifische Hemmung der CK2 führt zu einer erhöhten Insulinfreisetzung aus den pankreatischen β -Zellen [74]. Dieses komplexe System aus Wechselwirkungen, welche letztendlich die CK2 zu einem möglichen Angriffspunkt einer antidiabetischen Therapie machen, sind noch nicht vollends verstanden [4]. In ihrer Masterarbeit gelang es Michelle Völcker, weitere potenzielle Transkripte zu beschreiben, welche durch die CK2 reguliert werden. In einem Diabetes-assoziierten qRT-PCR-Array

konnte sie ENPP1 und FBP1 als neue Zielmoleküle der CK2 identifizieren. Mit dem Hemmstoff CX-4945 behandelte Ratten-Insulinoma Zellen (INS-1/832 13) wiesen eine um etwa Faktor 3 herunterregulierte mRNA-Expression der ENPP1 und FBP1 auf.

2.3 ENPP1 und FBP1

Ektonukleotidpyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 (ENPP1) findet sich als membranständiges Protein auf der Zelloberfläche, aber auch extrazellulär in sezernierter Form [93]. Ursprünglich als Marker für terminal differenzierte B-Zellen, noch PC-1 genannt, stellte sich schnell heraus, dass viele weitere Zelltypen ENPP1 exprimieren [13]. Wie auch andere Vertreter der ENPP-Familie bildet ENPP1 durch die Hydrolyse von Nukleotiden, Phospholipiden und Cholinphosphatestern Pyrophosphat [34,93]. Das aus der Hydrolyse von ATP oder GTP entstehende anorganische Pyrophosphat hemmt die Knorpel- und Knochenmineralisation [84].

Auch für die Differenzierung von Osteoblasten erwies sich ENPP1 als entscheidender Faktor. Aus ENPP1-Knock-out-Mäusen isolierte Zellen zeigten nach Stimulation mit Ascorbat eine fehlerhafte osteoblastische Differenzierung [76].

Mutationen mit Funktionsverlust im ENPP1-Gen sind mitursächlich für die generalisierte infantile arterielle Calcification und führen aufgrund ausgedehnter Verkalkungen der großen und mittleren Arterien meist innerhalb der ersten 6 Lebensmonate zum Tod [77].

Bereits in den 90er Jahren konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten ENPP1-Aktivität in Fibroblasten und Diabetes mellitus Typ II hergestellt werden [70]. Rekombinante Adenoviren, die zur Überexpression von humaner ENPP1 in Mäusen führen, resultierten in erhöhten Glucose- und Insulinspiegel [29]. Adipöse Patientinnen mit einem Gestationsdiabetes (GDM) wiesen ein erhöhtes ENPP1-Niveau im Fettgewebe im Vergleich zu Patientinnen ohne GDM oder Kontrollen auf [99].

Von der Fructose-Bisphosphatase sind zwei Isoformen bekannt, welche nach dem Ort der Erstisolierung Leber-FBPase (FBP1) und Muskel-FBPase (FBP2) benannt sind [41,96]. Die Fructose-1,6-Bisphosphatase 1 (FBP1) ist als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym an der Gluconeogenese beteiligt und damit ein zentraler Akteur im Energiestoffwechsel [97]. Erst das Vorhandensein der FBP1 und weiterer essentieller Enzyme ermöglicht bestimmten Geweben, wie der Leber und Nierenrinde, die Neubildung von Glucose [73]. Dabei katalysiert die Phosphofruktokinase-1 (PFK-1) die Reaktion zwischen Fructose-6-phosphat (F-6-P) und Fructose-1,6-bisphosphat (F-1,6-P₂) auf Seiten der Glykolyse und die Fructose-1,6-

Bisphosphatase in umgekehrter gluconeogenetischer Richtung [54]. Die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat durch PFK-1 benötigt ATP als Substrat, wobei Konzentrationen oberhalb 1 mM ATP die PFK-1 hemmen [24]. Als Stimulus der PFK-1 gelten dabei AMP und Fructose-2,6-Bisphosphat, die wiederum durch die Hemmung der FBP1 zur Glucosehomöostase beitragen [43,81].

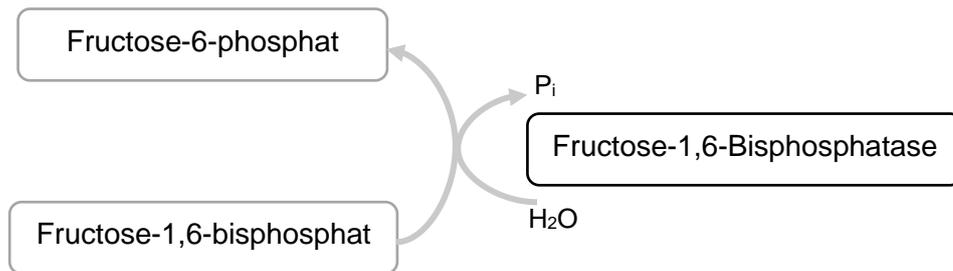


Abbildung 1 Reaktionsschritt der FBP1 innerhalb der Gluconeogenese

Die Abspaltung der Phosphatgruppe am C-Atom ist eine der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionen der Gluconeogenese. Diese findet überwiegend in der Leber, aber auch in der Niere statt.

Ein Mangel an FBP1 führt im Säuglingsalter zu schwerer Lactatazidose und Hypoglykämie. Während die Glucose deutlich erniedrigt vorliegt kommt es zur Anhäufung gluconeogenetischer Zwischenprodukte, deren weitere Reaktionsschritte durch den Mangel an FBP1 limitiert sind [79].

Aufgrund ihrer Bedeutung und Position innerhalb der Gluconeogenese wird FBP1 auch als Angriffspunkt einer T2DM-Therapie thematisiert. Die selektive Hemmung der FBP1 mittels AMP-Analogon MB06322 führte bei diabetischen Ratten zu einer dosisabhängigen Abnahme des Plasmaglucosespiegels [32]. Auch am Wirkmechanismus von Metformin scheint FBP1 beteiligt. Im Mausmodell ist die Wirkung von Metformin bei diabetischen Mäusen mit abgeschwächter FBP1-Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigt [51]. Hierbei wird als Wirkmechanismus des Metformin dessen Aktivierung der AMP-aktivierenden Proteinkinase vermutet, welche ein wichtiger Regulator des Lipid- und Glucosestoffwechsels ist [112].

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Die von Michelle Völcker in einem 84 Diabetes-assoziierte Gene umfassenden Array identifizierten CK2-abhängigen pankreatischen Zielmoleküle ENPP1 und FBP1 galten als Grundlage dieser Arbeit [100]. Durch den Einsatz eines speziellen qRT-PCR-Arrays wurden nach Hemmung der CK2 Genexpressionsprofile für 84 Diabetes-assoziierte Gene erstellt. Dabei konnte für ENPP1 und FBP1 jeweils eine mindestens 3-fache Herunterregulation festgestellt werden. Dieses Wissen trägt zum weiteren Verständnis CK2-abhängiger Signalwege in pankreatischen Zellen bei und klärt deren Einfluss auf die Pathogenese von Krankheiten, wie dem Diabetes mellitus [100].

Im Rahmen dieser Arbeit soll mit individuell entworfenen Primern eine etwaige Regulation von ENPP1 und FBP1 nach CK2-Inhibition ermittelt werden. Dafür wird die Genexpression der Zielmoleküle in der pankreatischen β -Zelllinie INS-1 832/13 nach Behandlung mit dem CK2-Inhibitor CX-4945 in qRT-PCR-Experimenten bestimmt. Die erhobenen Daten werden im Anschluss in einem anderen System überprüft. Veränderungen der Proteinexpression werden in kultivierten INS-1 832/13-Zellen und anschließenden Western-Blot-Analysen untersucht. Die CK2-Hemmung wird dabei auch mithilfe von CK2-siRNA transfizierten Zellen untersucht. Dies soll mögliche Nebeneffekte durch eine Hemmung der CK2 mit CX-4945 aufdecken. Aufgrund seiner entscheidenden Rolle innerhalb der Gluconeogenese gilt es, etwaige Effekte einer Regulation von FBP1 durch Hemmung der CK2 zu untersuchen. Besonders im Hinblick diabetischer Erkrankungen könnte die mögliche Interaktion der CK2 mit FBP1 bestehende Therapieansätze optimieren und die Entwicklung zukünftiger Therapien des T2DM voranbringen.

3 Materialien

3.1 Chemikalien und Enzyme

Artikel	Hersteller
2x RNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Acrylamid-Stammlösung Rotiphorese® Gel30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
APS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Complete™ Proteaseinhibitor Cocktail, EDTA-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CX-4945	Selleckchem, Houston
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
FCS	Biochrom GmbH, Berlin
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham

Glycerin	Sachgebiet 2 - Gefahrstoffe und Laborbedarf (ZBDS2), Saarbrücken
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham
PhosSTOP™ Phosphataseinhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RNase™ AWAY	Thermo Fisher Scientific, Waltham
RPMI 1640-Medium	Life Technologies, Darmstadt
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham
SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton® X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Tween® 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom GmbH, Berlin
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Diverse gewöhnliche Laborchemikalien	Merck KGaA, Darmstadt; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen; Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Fischer, Saarbrücken

3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
1.5 ml/2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
5 ml/10 ml Einmalspritze Injekt® Solo	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
15 ml/50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
6-/9-/24-/96-Well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
60/15mm,100/20mm Zellkulturschalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Amersham™ Hybond™ PVDF-Membran	GE Healthcare GmbH, Solingen
Beckman J2-HS Kühlzentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Brutschrank Heraeus 6000 mit CO ₂ -Begasung	Heraeus Holding GmbH, Hanau
CoolCell LX	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Dampfsterilisator Varioklav 500	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Elektrophoresekammer SE250 Mighty Small	Hofer Inc., Holliston
Eppendorf Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg
Glasplatten für Elektrophorese	Hofer Inc., Holliston
Feinwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Filterpapier 3MM	Whatman, Kent
Filterspitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Halbmikroküvetten aus Polystyrol	Sarstedt, Nümbrecht

Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge Sigma 4K10	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Labor-Glasware	Schott, Mainz
Leica DM IL 450C Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Luna™ Automated Cell Counter	Logos Biosystems, Villeneuve d'Ascq
Luna™ Cell Counting Slides	Logos Biosystems, Villeneuve d'Ascq
Magnetrührer MR3000, MR3002	Heidolph, Schwabach
Milli-Q UF Plus Wasserfiltrations-Reinigungssystem	Merck Millipore, Darmstadt
MJ Mini™ Personal Thermocycler	Bio-Rad, München
Mx3000P qPCR System	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara
NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
P81 Ionenaustausch-Filterpapier	Whatman, Kent
Parafilm M	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago
pH-Meter, pH537	WTW, Weilheim
Pipetten 2.5 µl , 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl,	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Pipettenspitzen	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Powergeräte	Pharmacia Biotech Inc., Piscataway
Sterilbank LaminAir® HBB 2448	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg

Thermoschüttler Certomat® H	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Ultraschallbad Transonic T460	Elma Schmidbauer GmbH, Singen
UV-Quarzküvette 10 mm	Hellma, Müllheim
UV-Transilluminator 302 nm	Bachofer GmbH, Reutlingen
UV-visible Spektrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Bioscience, München
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich
Waage Sartorius MC1 Laboratory	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL Laborgeräte, Burgwedel
Zeiss Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss AG, Oberkochen

3.3 Antikörper

3.3.1 Primärantikörper

Antigen	Details
<p>α-Tubulin</p> <p>MW ca. 55 kDa</p>	<p>Monoklonaler Mausantikörper (clone DM1A, T9026, Sigma-Aldrich, München)</p> <p>gelöst in 1x PBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver</p> <p>Verdünnung: 1:1000 (Western Blot)</p> <p>Inkubation für 1 h bei RT</p>
<p>Aktin</p> <p>MW ca. 43 kDa</p>	<p>Polyklonaler Ziegenantikörper (clone I-19, sc-1616, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)</p> <p>gelöst in 1x TBST (pH 7.4) mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver</p> <p>Verdünnung 1:1000 (Western Blot)</p> <p>Inkubation für 1 h bei RT</p>
<p>CK2α-Peptid</p> <p>MW ca. 42 kDa</p>	<p>Monoklonaler Mausantikörper 1A5 [89]</p> <p>gelöst in 1x PBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver</p> <p>Verdünnung 1:500 (Western Blot)</p> <p>Inkubation üN bei 4°C</p>
<p>CK2α'-Peptid</p>	<p>Kaninchenantiserum #30 (AS 330-349) [35]</p> <p>gelöst in 1x PBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver</p>

MW ca. 38 kDa	Verdünnung 1:1000 (Western Blot) Inkubation üN bei 4°C
CK2β-Peptid MW ca. 28 kDa	Polyklonales Kaninchenantiserum gelöst in 1x PBST (pH 7.4) mit 1% (w/v) Trockenmilchpulver Verdünnung 1:1000 (Western Blot) Inkubation für 1 h bei RT
ENPP1 MW ca. 140 kDa (human) 110 kDa (rodent)	Polyklonaler Kaninchenantikörper (L520 Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main) gelöst in 1x TBST (pH 7.4) mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver Verdünnung 1:1000 (Western Blot) Inkubation üN bei 4°C
FBP1 MW ca. 39 kDa	Monoklonaler Kaninchenantikörper (D2T7F Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main) gelöst in 1x TBST (pH 7.4) mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver Verdünnung 1:1000 (Western Blot) Inkubation üN bei 4°C
PARP MW ca. 89 kDa (Cleaved PARP) und 116 kDa PARP	Polyklonaler Kaninchenantikörper (#9542, Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main) gelöst in 1x TBST (pH 7.4) mit 5% (w/v) Trockenmilchpulver Verdünnung 1:1000 (Western Blot) Inkubation üN bei 4°C

3.3.2 Sekundärantikörper

Antigen	Details
Kaninchen IgG	Peroxidase-konjugierter Antikörper (aus Ziege, ab205718, Abcam, Cambridge) Verdünnung 1:30000 (CK2α', CK2β, GAPDH, HNF1β, Insulin, PARP, Pdx1) bzw. 1:2000 (CK2-Phospho-Substratmotiv, PPARγ (D69)) (Western Blot) Inkubation für 1 h bei RT
Maus IgG	Peroxidase-konjugierter Antikörper (aus Ziege, 115-035-146, Dianova, Hamburg) Verdünnung 1:10000 (1A5, α-Tubulin, CK2β (E-9)) bzw. 1:1000 (PPARγ (E-8)) (Western Blot) Inkubation für 1 h bei RT
Ziegen IgG	Peroxidase-konjugierter Antikörper (aus Kaninchen, 305-035-003, Dianova, Hamburg) Verdünnung 1:5000 (GST) bzw. 1:2000 (Aktin) (Western Blot) Inkubation für 1 h bei RT

3.4 Zellsysteme

Name	Beschreibung	Bezug
INS-1 832/13	Ratten-Insulinoma- β -Zelllinie, Glucose-responsiv Passagen ≤ 60	[7]
McA-RH777	Ratten-Hepatom-Zelllinie Passagen ≤ 60	ATCC [®] CRL-1601 [™]

3.5 qRT-PCR Primer

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Orientierung	T _m [°C]	T _a [°C]
ACTB_fw	CCT CTG AAC CCT AAG GCC AAC CGT GA	5'	66.1	60
ACTB_rv	GGA CAA CAC AGC CTG GAT GGC TAC G	3'	65.6	
ENPP1_fw	GCACATGTGACCCTTCGATTGTGCCG	5'	66.1	61.1
ENPP1_rv	ACAGGGGCATGAGGAGGTCCAGGC	3'	69.5	
FBP1_fw	CATCTGGAAAGCTGCGGCTGCTGTACG	5'	67.5	62.1
FBP1_rv	AGGGACGGCCTTGATTTGGCTTTGTCC	3'	67.1	
HPRT1_fw	ACC CTC AGT CCC AGC GTC GTG AT	5'	65.9	60
HPRT1_rv	TGG CCT CCC ATC TCC TTC ATG ACA TCT C	3'	65.2	

3.6 Experimentelle Kits

Tabelle 1 Verwendete Kits

Artikel	Hersteller
Cell Proliferation Reagent WST-1	Merck KGaA, Darmstadt
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Merck KGaA, Darmstadt
Glucose-Glo™ Assay	Promega Corporation, Madison
ORA™ qPCR Kit Green ROX L Mix, 2X	highQ GmbH, Kraichtal
qScriber™ cDNA Synthesis Kit	highQ GmbH, Kraichtal
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RT ² SYBR Green ROX qPCR Mastermix	Qiagen GmbH, Hilden

3.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 2 Puffer für RNA-Extraktion

Bezeichnung	Hersteller
RLT-Puffer Catalog No.: 79216	Qiagen GmbH, Hilden
RPE-Puffer Catalog No.: 1018013	Qiagen GmbH, Hilden
RW1-Puffer Catalog No.: 1053394	Qiagen GmbH, Hilden

Tabelle 3 Stocklösungen und Medien für Zellkulturen

CX-4945-Stocklösung	10 mM CX-4945 gelöst in DMSO Lagerung aliquotiert bei -80°C
Krebs-Ringer-Puffer	120 mM NaCl 5 mM KCl 2 mM CaCl ₂ H ₂ O 1 mM MgSO ₄ 7H ₂ O 1 g/L BSA

Trypsin/EDTA-Lösung, pH 7.1	0.25% (w/v) Trypsin 0.1% (w/v) EDTA gelöst in 1x PBS, sterilfiltriert Lagerung bei 4°C
-----------------------------	---

Tabelle 4 Stocklösungen und Puffer für Proteinextraktion

Complete™ Proteaseinhibitor (25x)	1 Tablette gelöst in 2 ml H ₂ O _{deion} Lagerung aliquotiert bei -20°C
PBS (1x), pH 7.4	137 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 2.7 mM KCl 1.5 mM KH ₂ PO ₄ gelöst in H ₂ O _{deion} Lagerung bei 4°C
PhosSTOP™ Phosphataseinhibitor (10x)	1 Tablette gelöst in 1 ml H ₂ O _{deion} Lagerung aliquotiert bei -20°C
Lysepuffer, pH 7.4	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% (v/v) Triton X-100 gelöst in H ₂ O _{deion} Lagerung bei -20°C

Tabelle 5 Stocklösungen und Puffer für SDS-Polyacrylamidelektrophoresen

APS	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat gelöst in H ₂ O _{deion} Lagerung bei -20°C bzw. 4°C kurzzeitig
Elektrophoresepuffer (10x)	250 mM Tris-HCl, pH 8.8 1.92 M Glycin 35 mM SDS gelöst in H ₂ O _{deion} Lagerung bei Raumtemperatur
Gellösung A, Acrylamid-Stammlösung (gebrauchsfertig)	30% (w/v) Acrylamid 0.8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid Lagerung bei 4°C
Gellösung B, Trenngel	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 14 mM SDS gelöst in H ₂ O _{deion} Lagerung bei 4°C

Gellösung C, Sammelgel	495 mM Tris-HCl, pH 6.8 14 mM SDS gelöst in H ₂ O _{deion} Lagerung bei 4°C
Lämmli-SDS-Probenpuffer (3x)	65 mM Tris-HCl, pH 8.8 10% (v/v) Glycerin 5% (v/v) β-Mercaptoethanol 2% (w/v) SDS 0.01% (w/v) Bromphenolblau Lagerung bei 4°C bzw. Raumtemperatur kurzfristig

Tabelle 6 Puffer für Western Blot und Proteindetektion

Blockpuffer, pH 7.4	5% (w/v) Trockenmilchpulver oder 5% (w/v) BSA 0.1% (v/v) Tween 20 gelöst in 1x PBS oder 1x TBS (AK abhängig) Lagerung bei 4°C
Inkubationspuffer, pH 7.4	1% bzw. 5% (w/v) Trockenmilchpulver oder 5% (w/v) BSA 0.1% (v/v) Tween 20 gelöst in 1x PBS oder 1x TBS (AK abhängig) Lagerung bei 4°C
TBS (10x)	0.2 M Tris-HCl, pH 7.4 1.5 M NaCl gelöst in H ₂ O _{deion} Lagerung bei Raumtemperatur
Transferpuffer (10x)	200 mM Tris-HCl, pH 8.3 1.5 M Glycin gelöst in H ₂ O _{deion} Lagerung bei 4°C
Waschpuffer, pH 7.4	0.1% (v/v) Tween 20 gelöst in 1x PBS oder 1x TBS (AK abhängig) Lagerung bei 4°C

Tabelle 7 Puffer für CK2-in vitro-Kinaseassay

CK2-Kinasepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O 1 mM DTT gelöst in H ₂ O _{deion} Lagerung bei -20°C
CK2 Reaktionsmix, pH 8.5	41.6 mM Tris-HCl 250 mM NaCl 8.4 mM MgCl ₂

	2 mM DTT 84 mM ATP gelöst in H ₂ O _{deion} Lagerung aliquotiert bei -20°C Additiv bei Verwendung: 0.32 mM synthetisches Peptid für CK2
--	---

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgt fotometrisch über eine Messung der optischen Dichte [46]. Möglich ist dies, da die Basen der Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm aufweisen. Das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreibt dabei den Zusammenhang der Abnahme von monochromatischem Licht beim Durchdringen eines absorbierenden Stoffs [83].

Die Extinktion E wird dabei wie folgt berechnet:

$$E = \varepsilon \times c \times d$$

(ε = molarer Extinktionskoeffizient [Stoffkonstante]; c = Konzentration in mol/l; d = Schichtdicke der Messlösung im Strahlengang in cm)

Für die Berechnung der Konzentration an Nukleinsäuren wird die Extinktion bei 260 nm (OD_{260}), der verwendete Verdünnungsfaktor sowie der spezifische Umrechnungsfaktor, abhängig davon, ob es sich um dsDNA, bzw. RNA oder ssDNA handelt, benötigt [46]. Zur weiterführenden qualitativen Beurteilung empfiehlt sich eine weitere Messung der optischen Dichte bei 280 nm. Diese Wellenlänge wird von einigen Aminosäuren mit aromatischen Seitengruppen absorbiert und weist bei einem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} von etwa 1.8-2.0 auf reine DNA hin [83]. Zur Abschätzung von organischer Verunreinigung erfolgt eine weitere Messung bei 230 nm. Der resultierende Quotient der OD-Werte OD_{260}/OD_{230} sollte hierfür bei 2.0 oder höher liegen [56].

4.1.2 RNA-Extraktion

Die Isolation von RNA aus Zellen geschieht durch das RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen.

Die Proben werden mit einem Puffer lysiert, dessen hoher Guanidin-Thiocyanat-Gehalt eine starke denaturierende Wirkung zeigt. Um im folgenden Schritt die Bindungsbedingungen der RNA an eine Silikagelmembran zu optimieren, wird Ethanol beigemischt. Fixiert an der Membran folgen mehrere Waschstritte zur Entfernung von Verunreinigungen und anschließend eine Elution mit Wasser.

Von den in einer 10 cm Schale kultivierten Zellen werden bis zu 7×10^6 Zellen zur RNA Extraktion eingesetzt. Die geernteten und pelletierten Zellen oder ein aufgetautes Zellpellet werden anschließend in 600 μ l RLT-Buffer lysiert. Das Lysat wird auf eine QIAshredder-Säule überführt, welche wiederum in einem 2 ml Reaktionsgefäß platziert ist. Durch die Zentrifugation für 2 Minuten bei maximaler Drehzahl kommt es zur Homogenisierung des Lysats und dessen Durchfluss durch die Säule. Der eingesetzte QIAshredder kann verworfen werden. Dem Durchfluss wird das gleiche Volumen Ethanol (70%) zugeführt und durch vorsichtiges Pipettieren vermischt. Bis zu 700 μ l der Probe lassen sich auf eine RNeasy-Säule transferieren, welche in einem 2 ml Reaktionsgefäß platziert wird. Für 15 s bei 8000 x g wird die Säule zentrifugiert und der Schritt mit der restlichen Probe wiederholt. Hierbei wird der Durchfluss beide Male verworfen. Es folgt ein erster Waschschrift mit 700 μ l RW1-Puffer, welcher nach 15 s Zentrifugation bei 8000 x g als Durchfluss verworfen werden kann. Zwei weitere Waschschriffe mit jeweils 500 μ l RPE-Puffer folgen, wovon Ersterer erneut 15 s bei 8000 x g in ein neues, steriles Reaktionsgefäß zentrifugiert wird. Auf den letzten RPE-Waschschrift folgt eine Zentrifugation von 2 Minuten bei 8000 x g, welche für eine Trocknung der Membran sorgt und mögliche Reste des Ethanols entfernt. Die getrocknete Säule wird in ein steriles 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und in zwei Schritten mit jeweils 50 μ l RNase-freiem H₂O für 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert und so eluiert. Kurzzeitig ist eine Lagerung der isolierten RNA bei -20°C möglich. Langfristig sollte jedoch eine Lagerung bei -80°C angestrebt werden.

4.1.3 Primerdesign

Primer sind kurze Fragmente, bestehend aus DNA, welche komplementär zum 5'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz sind. Sie dienen als Startpunkt der DNA-Polymerase.

Für die Durchführung der qRT-PCR-Untersuchungen der Gene ENPP1 und FBP1 sind spezifische Primer notwendig. Da die jeweiligen Sequenzen der Primer aus dem von M. Völcker durchgeführten Array nicht bekannt sind, war es notwendig, geeignete Primer individuell zu entwerfen. Zu beachten gilt für exakte Primer, dass neben einer Länge zwischen 18-25 nt auch das Risiko der Dimerbildung minimiert werden sollte. Es wird eine Schmelztemperatur (T_m-Wert) zwischen 55 und 65°C angestrebt. Dabei sollte eine möglichst geringe Differenz der Werte für die beiden Primer vorliegen.[45].

Die genannten T_m-Werte mussten durch die Verwendung des ORA™ qPCR Green ROX L Mix, 2X Kits von highQ und den damit einhergehenden Herstellerangaben eine Annealing-Temperatur von mindestens 60°C aufweisen.

Das Design der Primer wurde mit NCBI primer-BLAST der U.S. National Library of Medicine entworfen. Die Kontrolle auf Komplementarität und Dimerbildung erfolgte mit Emboss Needle von EMBL-EBI Hinxton.

4.1.4 Reverse Transkription und Quantitative Real-Time-PCR

Mithilfe der qRT-PCR ergibt sich die Möglichkeit, PCR-Produkte während jedes Zyklus zu quantifizieren. Die Kopien entstehen dabei exponentiell von Zyklus zu Zyklus. Die Ergebnisse dieser Messung lassen Rückschlüsse auf die eingesetzte Menge an DNA zu [6].

Als vorangestellten Schritt wird die zuvor isolierte RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese dient in der folgenden qRT-PCR-Anwendung als Matrize der weiteren Kopien. Da dieser Syntheseschritt getrennt von der eigentlichen PCR zu realisieren ist, wird dieses Verfahren als zweistufig bezeichnet [42].

Für die Durchführung dieser Methode ist die spezielle Kombination eines Thermo-Cyclers mit einem Fluoreszenzphotometer nötig. Während bei einer Standard-PCR nach Abschluss aller Zyklen die Ermittlung der DNA-Menge erfolgt, findet die Messung bei der qRT-PCR in Echtzeit zum Ende eines jeden Zyklus statt [83].

Der Wert, ab welchem eine exponentielle Vermehrung des Amplifikats einsetzt, wird als CT-Wert (cycle threshold) der jeweiligen Probe bezeichnet [57]. Die Auswertung der Daten aus den qRT-PCR-Experimenten erfolgte dabei gemäß der $\Delta\Delta CT$ -Methode. Die CT-Werte der Proben werden auf die CT-Werte der Referenzgene normiert. Abweichende Mengen der eingesetzte cDNA von Ziel- und Kontrollgenen werden somit ausgeglichen. Hierfür wird vom Mittelwert der CT-Werte des Zielgens der entsprechende Mittelwert der CT-Werte der Kontrollgene abgezogen.

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$$

Der berechnete ΔCT -Wert wird anschließend auf den ΔCT -Wert der Referenzprobe normiert. Dabei handelt es sich um den ΔCT -Mittelwert der in dieser Arbeit verwendeten DMSO-Lösungsmittelkontrollen.

Zur folgenden Berechnung des $\Delta\Delta CT$ -Wert wird der ΔCT -Wert der Referenzproben von den ΔCT -Werten der jeweiligen DMSO- bzw. CX-4945 behandelten Proben subtrahiert.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Probe}} - \Delta CT_{\text{Referenzprobe}}$$

Mittels dem $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert lässt sich die n-fache Expression der mRNA durch folgende Formel bestimmen.

$$n = 2^{-\Delta\Delta\text{CT-Wert}}$$

Das in dieser Arbeit verwendete Kit ORA™ qPCR Green ROX L Mix der Firma highQ verlangte folgende Zusammensetzung eines qPCR Ansatzes:

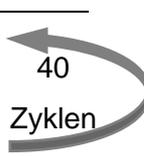
Tabelle 8 qRT-PCR Zusammensetzung

Komponenten	10 µl Reaktionsansatz
RNAse-freies H ₂ O	1.75 µl
ORA™ qPCR Mix, 2x	5 µl
Forward Primer 2 µM	1.5 µl (300 nM)
Reverse Primer 2 µM	1.5 µl (300 nM)
cDNA Template	0.25 µl

Zur Anwendung kam ein Thermocycler *MJ MiniOpticon™ real time PCR system* der Firma Bio-Rad mit variablen Einstellungsoptionen bezüglich Anzahl, Dauer und Temperatur der einzelnen Zyklen.

Tabelle 9 zeigt dabei das angewendete Zeit- und Temperaturschema.

Tabelle 9 qRT-PCR Schema

Prozess	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98°C	3 min	 40 Zyklen
Denaturierung der DNA	98°C	10 s	
Anlagerung der Primer	68.7°C	20 s	
DNA-Synthese	72°C	21 s	
Komplettieren der Synthese	72°C	10 min	

4.2 Zellkulturtechniken

4.2.1 Kultivieren von Zellen

Die in der Arbeit verwendeten Insulinom- und Hepatomazellen der Ratte werden bei einer konstanten Temperatur von 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%, sowie einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Als Nährmedium der adhärenzte β -Zelllinie INS-1 832/13 wird RPMI1640 (11 mM Glucose, 2 mM L-Glutamin) der Firma Life Technologies verwendet, welches mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS), 1 mM Natriumpyruvat und 1.75 μ l β -Mercaptoethanol pro 0.5 l versetzt wurde. Die Hepatomzelllinie McA-RH7777 wird mit DMEM (4.5 g/L Glucose, 4 mM l-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat) der Firma Life Technologies kultiviert.

4.2.2 Passagieren von Zellen

Nach Entfernen des Kulturmediums werden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 2-5 min in 2 ml Trypsin/EDTA (0.25% (w/v) Trypsin, 0.02% EDTA) inkubiert. EDTA bindet als Chelatbildner die für Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Ca²⁺-Ionen, während Trypsin die Proteinbrücken zwischen den Zellen und zum Gefäßboden spaltet. Beide tragen so zum Separieren der Zellen bei. Durch Abklopfen der Schale kommt es ebenfalls zu einem mechanischen Lösen der Zellen. Anschließend, in frischem Kulturmedium aufgenommen, kann die Suspension in einem neuen Kulturgefäß ausgesät werden. Alle Zellkulturarbeiten werden zur Vermeidung von Kontaminationen unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

4.2.3 Tauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wird das Kryo-Röhrchen kurzzeitig in warmen Wasser (35°C) aufgetaut und die Suspension anschließend in ein steriles 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Tropfenweise wird 10 ml kaltes Nährmedium ohne Zusätze zugefügt, um das zur Kryokonservierung verwendete DMSO zu verdünnen. Nach der Zentrifugation (5 min, 253 x g, 4°C) wird der Überstand dekantiert und das Pellet in 6 ml Nährmedium mit Zusätzen resuspendiert. Die Aussaat erfolgt in einer 10 cm Zellkulturschale mit Mediumwechsel am Folgetag zur Entfernung von Totmaterial.

4.2.4 Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung werden die Zellen wie in Abschnitt 4.2.2 trypsinisiert und in wenigen Millilitern kaltem Nährmedium frei von Zusätzen aufgenommen. Nach Überführung in ein 15 ml Reaktionsgefäß folgt ein Zentrifugationsschritt (5 min, 253 x g, 4°C). Nach Entfernung des Überstands wird das Zellpellet in 0.75 ml Zellkulturmedium versetzt und mit 40% FCS resuspendiert. Tropfenweise und unter Schüttelbewegungen werden weitere 0.75 ml Zellkulturmedium, versetzt mit 20% DMSO, hinzugefügt. Das Kryo-Röhrchen wird zügig in einen CoolCell®-Fläschchenbehälter überführt und über Nacht bei -80°C gelagert. Das Behältnis ermöglicht einen konstanten Temperaturabfall von 1°C/min. Bis zu einer weiteren Verwendung der Zellen werden die Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2.5 Ernten von Zellen

Das Prozedere der Zellernte wird je nach Verwendungszweck des gewonnenen Materials unterschieden. Ist die Herstellung von Gesamtzellextrakten zur anschließenden Proteinanalyse das Ziel, werden die Zellen mechanisch vom Gefäßboden gelöst. In wenigen Millilitern 1 x PBS suspendiert, gelingt die Mobilisation der Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturschale. Soll auf die Zellernte eine RNA-Extraktion folgen, werden die Zellen wie beim Passagieren trypsinisiert und anschließend in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. In zwei Zentrifugationsschritten (7 min, 253 x g, 4°C) werden die Proben pelletiert und der Überstand jeweils dekantiert. Nach der letzten Zentrifugation wird der Überstand möglichst vollständig entfernt und die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei mindestens -20°C gelagert.

4.2.6 Behandlung von Zellen

Einen Tag vor der Behandlung mit dem Hemmstoff CX-4945 werden die Zellen so ausgesät, dass am Behandlungstag mit einer Konfluenz von ungefähr 60-70% zu rechnen ist. Die gewünschte Menge Hemmstoff wird zur Prävention lokaler Konzentrationsunterschiede zuvor unter sterilen Bedingungen in das entsprechende Nährmedium eingebracht. Im Rahmen eines Mediumwechsels wird die Behandlung begonnen und je nach Versuchsplanung auf den Zellen belassen. CX-4945 liegt als 10 mM Stammlösung in DMSO vor. Aus diesem Grund wird als Negativkontrolle jeweils ein Ansatz mit der adäquaten Menge DMSO zum Hemmstoff angefertigt.

4.2.7 Transfektion von Zellen

Das Einbringen von siRNA in die Zellen erfolgt unter Verwendung eines Transfektionsreagenz. Dieses besteht unter anderem aus ungeladenen und geladenen Lipiden. Kationische Lipide, welche am negativ geladenen Phosphatrückgrad der siRNA binden, bilden so Komplexe aus. Proteine im Zellkulturmedium können die Komplexbildung stören, weshalb serumfreies Medium für die Transfektion notwendig ist. Durch die neutralen Lipide wird die Fusion der siRNA-Komplexe mit der negativ geladenen Plasmamembran vermittelt.

Für eine Transfektion am Folgetag werden die Zellen so ausgesät, dass am Tag der Behandlung eine ungefähre Konfluenz von 70-80% vorliegt. Die Transfektion erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers Dharmacon in einer 6 Well-Platte. Die entsprechende Menge siRNA wird in serumfreiem Medium mit dem Transfektionsreagenz gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz besteht dabei pro Well aus 100 nM siRNA in 196.5 µl serumfreien Medium und 10 µl DharmaFECT in 190 µl serumfreien Medium. Anschließend wird der Ansatz auf die Zellen pipettiert und über die gewünschte Zeitdauer bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Die Auswertung der Herunterregulation erfolgte nach 72 Stunden durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität der CK2 mittels *in vitro*-Kinaseaktivitätsmessung und Western-Blot-Analysen.

4.3 Proteinanalysen und immunologische Arbeitsmethoden

4.3.1 Herstellung von Zelllysaten für Proteinanalysen

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten werden die Zellen ,wie unter 4.2.5 beschrieben, geerntet und pelletiert. Dem Zellpellet wird das doppelte bis dreifache Volumen Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X.100) zugegeben, welcher zusätzlich mit dem Proteinaseinhibitor Complete™ (1:25) und Phosphataseinhibitor PhosSTOP™ (1:10) versetzt wurde. Darin resuspendiert, wird das Zellpellet 20 Minuten auf Eis inkubiert. Bei der folgenden Zentrifugation (30 min, 14000 x g, 4°C) werden Zelltrümmer sedimentiert. Der Überstand kann als Gesamtzellextrakt in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Bei zeitnaher Weiterverwendung ist eine Lagerung bei -20°C ausreichend. Langfristig sollte die Probe jedoch bei -80°C aufbewahrt werden.

4.3.2 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford ist eine etablierte sensitive Methode, welche die Probenkonzentration photometrisch messbar macht. Dabei bewirkt die Bindung von basischen Aminosäureresten an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 eine Verschiebung des Absorptionsmaximums [19,82]. Ausgehend von einem Absorptionsmaximum ergibt sich durch die Bindung eine Farbänderung. Deren Messung erfolgt bei 595 nm [69]. Dabei ist die Intensität der Absorption direkt proportional zur Proteinkonzentration in Lösung [33].

Die Proteinkonzentration wurde mittels Protein Assay Dye Reagent Concentrate von Bio Rad bestimmt. Dazu wird 1 µl Gesamtzelleextrakt mit 800 µl H₂O_{deion} und 200 µl Bradfordreagenz in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und gevortext. Anschließend an eine 5-minütige Inkubationszeit wird die Absorption der Probe in einer Halbmikroküvette gemessen. Die Proben werden jeweils als Doppelansatz bestimmt und gegen einen Leerwert aus Farblösung gemessen.

4.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe gelingt mit Hilfe einer Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese. In dieser Arbeit kamen aufgrund der Proteingrößen von 28-140 kDa 10 bzw. 12.5%ige Gele zum Einsatz. Die Zusammensetzungen der einzelnen Gele sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Das Trenngel wird in einer Kammer, bestehend aus zwei gereinigten Glasplatten, für ca. 30 min auspolymerisiert. Dieser Schritt findet unter Luftabschluss statt, weswegen die Gellösung mit wenigen Millilitern Isopropanol überschichtet wird, während sie aushärtet. Als Starter, bzw. Katalysator dieser radikalischen Reaktion, dienen Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED). Nach der vollständigen Polymerisation wird das Isopropanol entfernt und die Kammer mit der Sammelgellösung befüllt. Durch das Einsetzen eines Kammes entstehen so die Taschen für die spätere Probenbeladung. Nach weiteren 25 min können die Kämme gezogen und das Gel in feuchtem Papier eingeschlagen bis zur Verwendung bei 4°C gelagert werden. Durch Aufkochen der Proben werden die Proteine denaturiert. Die Bindung von SDS verleiht allen Proteinen eine negative Ladung [101]. Anschließend können die Proben auf ein Polyacrylamidgel geladen werden. Wird eine Spannung an das Gel angelegt, wandern die Proteine durch die poröse Netzstruktur hin zur Kathode. Dabei wandern kleinere Proteine schneller durch die Gelmatrix.

Tabelle 10 Zusammensetzung der Trenngel und des Sammelgels für SDS-PAGE

	Trenngel		Sammelgel
C _{Polyacrylamid}	10%	12.5%	4.3%
Gellösung A	12 ml	15 ml	2.2 ml
Gellösung B	9 ml	9 ml	-
Gellösung C	-	-	3.8 ml
H ₂ O _{deion.}	15 ml	12 ml	9 ml
APS	200 µl	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	20 µl	40 µl

Zur Durchführung einer SDS-PAGE wird das entsprechende Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.8, 192 mM Glycin, 3.5 mM SDS) bedeckt. Die für 5 min bei 95°C aufgekochten Proben werden mit einem passenden Proteingrößenstandard in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgt für etwa 1.5 Stunden bei 35 mA.

4.3.4 Western-Blot und Immundetektion

Durch die vorausgegangene SDS-PAGE liegen die Proteine, ihrer Größe entsprechend aufgetrennt, in der Polyacrylamidgelmatrix vor. Zur Detektion mittels spezifischer Antikörper müssen die Proteine fixiert werden. Hierzu werden die Proteine durch Anlegen einer Spannung auf eine zuvor mit Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran überführt. Diese ,als Western-Blot bezeichnete, Methode wird in der hier vorliegenden Arbeit als Tank-Blot-System durchgeführt. Folgender Aufbau des Systems wurde verwendet:

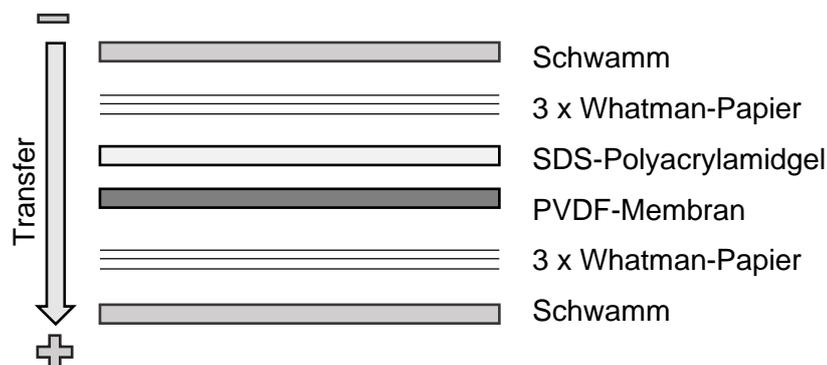


Abbildung 2 Aufbau Tank-Blot-System

Vor Versuchsbeginn werden Schwämme und Whatman-Papiere mit 1 x Transferpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 150 mM Glycin) befeuchtet. Der Transfer der Proteine erfolgt bei einer Spannung von 80 V für 1 h.

Im Anschluss wird die Membran für 1 h in einem Blockpuffer (1x PBST (pH 7.4, 0.1% Tween 20) 5% (w/v) Trockenmilchpulver) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Für 1 - 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht folgt die Inkubation mit einem primären Antikörper, welcher, je nach Vorgaben, 1% bzw. 5% Trockenmilchpulver in 1x PBST gelöst ist. Zur Entfernung ungebundener Antikörper folgen 3 Waschschrte mit 1x PBST je 10 min bei RT. Die Inkubation des sekundären Peroxidase-konjugierten Antikörper erfolgt für 1 h bei RT ebenfalls in Inkubationspuffer gelöst. Durch 3 Waschschrte (je 5 min) werden unspezifisch gebundene sekundäre Antikörper entfernt. Die folgende Detektion des sekundären Antikörpers geschieht dabei durch Einsatz des SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Zusammensetzung aus H₂O₂-Lösung und Luminol-Lösung im Verhältnis 1:1 ermöglicht die durch die Meerrettich-Peroxidase katalysierte Chemolumineszenzreaktion mittels ChemiDoc XRS-System zu erfassen und im Anschluss durch die Software Quantity One 4.6.5 densitometrisch auszuwerten.

Besonders schwache Signale können dabei alternativ mittels SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, ebenfalls von Thermo Fisher Scientific, behandelt werden.

Die Membran kann anschließend getrocknet und zwischen Filterpapier bei kühler Lagerung aufbewahrt werden. Eine erneute Verwendung bedarf einer Aktivierung der Membran in Methanol.

4.3.5 *In vitro*-CK2-Kinaseaktivitätsmessung

Zur Bestimmung von enzymatischer Aktivität der CK2 im Zellextrakt wird der Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat (³²PO₄³⁻) in ein synthetisches Substratpeptid mit der Sequenz RRRDDDSDDD gemessen [72]. Das enthaltene Serin kann dabei durch die CK2 phosphoryliert werden. Die eingebaute Menge an markiertem Phosphat kann durch Messung der Čerenkov-Strahlung ermittelt werden. Nach erfolgter Zellernte und Aufschluss mittels Lysepuffer werden 30 µg in 20 µl CK2-Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) gelöst. Der Zugabe von 30 µl CK2-Reaktionsmix (41.6 mM Tris-HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 8.4 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 84 µM ATP, 0.32 mM synthetisches Peptid, 10 – 20 µCi [³²P]- γ-ATP/1 ml) folgt die Inkubation des Ansatzes für 5 min bei 37°C. Weitere 5 min Lagerung auf Eis stoppen die Reaktion. 30 µl der Probe werden auf Whatman P81 Ionenaustausch-Filterpapier pipettiert, welches das Peptidsubstrat fixiert. Das Filterpapier wird

je 5 min 3 x mit 85 mM Phosphorsäure und einmalig mit Ethanol gewaschen, was nicht eingebautes Phosphat entfernt. Nach der Trocknung unter Rotlicht wird das Whatman-Papier in ein Szintillationsröhrchen überführt, bevor die Čerenkov-Strahlung im Szintillationszähler gemessen und damit die Aktivität der Probe bestimmt werden kann. Die Proben werden jeweils als Doppelansatz gemessen. Als Kontrollen werden jeweils 20 µl CK2-Kinasepuffer als Negativ-Kontrolle und 19 µl CK2-Kinasepuffer mit 1 µl CK2-Holoenzym als Positiv-Kontrolle mitgeführt.

Die radioaktiven Arbeiten wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. Claudia Götz durchgeführt.

4.3.6 Glucose-Biolumineszenz-Assay

Zur Messung von Glucose in Proben eignet sich die Bestimmung mittels Biolumineszenz-Assay. Auch der Nachweis von Änderungen der Glykolyse oder Gluconeogenese wird hierdurch möglich. Hierbei wird das bei der Glucoseoxidation entstehende NADH mit einem biolumineszierenden Nachweis gekoppelt. In Gegenwart von NADH wird durch eine Reduktase Pro-Luciferin in Luciferin umgewandelt, welches im Zusammenspiel mit rekombinanter Luciferase und ATP Licht emittiert. Dabei ist das Lumineszenzsignal der Reaktion proportional zur Menge an Glucose in der Probe.

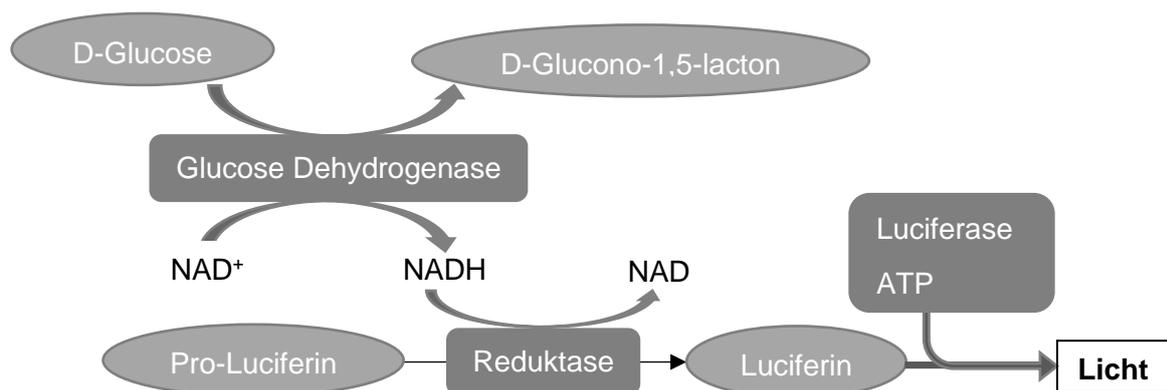


Abbildung 3 Schema Glucose Biolumineszenz entsprechend verwendetem Glucose-Glo™ Assay von Promega

Glucose wird durch die Glucose Dehydrogenase zu D-Glucono-1,5-lacton oxidiert. Dabei entsteht NADH aus NAD⁺. Pro-Luciferin wird in Gegenwart von NADH und Pro-Luciferin-Reduktase zu Luciferin reduziert. In einer Luciferin-Detektion wird durch Luciferase in Kombination mit ATP Licht emittiert, welches mit einem Luminometer zu messen ist.

Die Komponenten des Assay werden gefroren bei -20°C gelagert und müssen vor Benutzung aufgetaut werden. Mit Ausnahme der Luciferin-Detektionslösung werden die Komponenten auf Eis vorbereitet. Die Luciferin-Detektionslösung sollte vor Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt werden. Abhängig von der Messung der Glucose extrazellulär, intrazellulär oder der Kombination, müssen des Weiteren eine Inaktivierungslösung (0.6 N HCl) und eine Neutralisationslösung (1 M Tris-Base) vorbereitet werden. Zur Inaktivierung und Lyse der Zelle wird $1/8$ des Probenvolumens an Inaktivierungslösung hinzugefügt.

Folgende Mengen der Komponenten sind für einen $50\ \mu\text{l}$ -Ansatz vorzubereiten und werden anschließend durch fünfmaliges Invertieren des Reaktionsgefäß vermengt.

Luciferin Detektionslösung	50 μl
Glucose Dehydrogenase	2.0 μl
Reductase	0.25 μl
Reductase-Substrat	0.25 μl
NAD	0.25 μl

Abbildung 4 Zusammensetzung eines Ansatz des Glucose-Glo™ Assay

Zur Messung werden $50\ \mu\text{l}$ der Probe in eine 96-Well-Platte überführt und mit der gleichen Menge vorbereiteter Glucose-Detektionslösung 30-60 s geschwenkt. Anschließend wird die Platte 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach kann die Lichtemission der Proben mittels Luminometer ermittelt werden.

Zur Einordnung der gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) wird jede Messung um eine Negativkontrolle und Glucose-Titrationskurve ergänzt. Die Negativkontrolle besteht dabei aus der Glucose Detektionslösung ohne Probe und soll die Hintergrundaktivität des Kit abbilden. Die Glucose-Standardkurve von $0.0031\ \mu\text{M}$ bis $50\ \mu\text{M}$ liefert Vergleichswerte zur in den Proben enthaltenen Konzentration an Glucose.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung des geeigneten Modellsystems

Die Zelllinie INS-1 832/13 eignet sich aufgrund ihrer stabileren Reaktion auf Glucose zur Darstellung der pankreatischen β -Zellfunktion [48]. Als Derivat der INS-1-Zelllinie, deren Ursprung in röntgenbestrahlten, transplantierbaren Insulinomzellen der Ratte liegt, zeigen INS-1 832/13 morphologisch ähnliche Eigenschaften nativer pankreatischer β -Zellen [7]. Die verwendeten INS-1 832/13 Zellen weisen jedoch im Gegensatz zu INS-1 eine deutlich höhere Insulinsekretion auf, welche eher der physiologischen Reaktion entspricht. Die entsprechend höhere Insulinantwort ist auf eine Transfektion der Zellen mit einem ,dem humanen Proinsulin-Gen enthaltenen, Plasmid zurückzuführen [49]. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol ermöglicht den Zellen, ähnlich dem physiologischen Vorbild, sich adhärent in Verbänden zu bündeln [7]. Folgende Abbildung zeigt in der Hellfeldaufnahme typisches Wachstum von INS-1 832/13. Die adhärennten Zellen bilden, ähnlich dem physiologischen Ursprungsgewebe, Inselverbände.

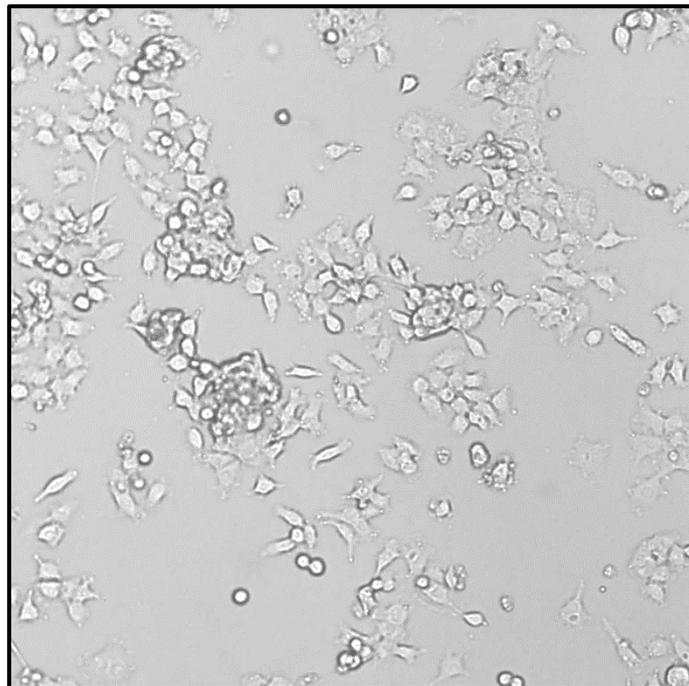


Abbildung 5 Hellfeldaufnahme INS-1 832/13-Zellen in 200x Vergrößerung

Die Aufnahme mit einem Leica DM IL 450 Mikroskop zeigt INS-1 832/13-Zellen, welche adhärennt in Verbänden wachsen.

5.2 Primerdesign für qRT-PCR von ENPP1 und FBP1

Für die geplante Bestimmung der mRNA-Expression der Gene ENPP1 und FBP1 galt es, geeignete Primer zu entwerfen. Diese mussten dabei unter anderem Vorgaben bezüglich Länge, Zusammensetzung und Schmelztemperatur erfüllen (siehe 4.1.4). Das jeweilige Design wurde mittels der Software NCBI primer-Blast entworfen. Das verwendete Programm erstellt daraufhin eine Auswahl an möglichen Primern. Für ENPP1 ergab sich dabei das Primerpaar ENPP1 (forward) *GCACATGTGACCCTTCGATTGTGCCG* und ENPP1 (reverse) *ACAGGGGCATGAGGAGGTCCAGGC* mit der höchsten Übereinstimmung zu den Vorgaben. Auch die Annealing-Temperatur von 61.1°C lag über dem vom ORA™ qPCR Green ROX L Mix Kit verlangten Minimum von 60°C. Abbildung 6 zeigt exemplarisch die Schmelzkurve des Primerpaares unter der Verwendung von cDNA aus INS-1 832/13-Zellen und einer Kontrolle ohne cDNA-Matrize. Horizontal aufgetragen ist dabei die Temperatur in °C und ΔRn als Ordinatenachse dargestellt. ΔRn ist das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffes dividiert durch den Fluoreszenzwert der Basislinie. Der Schmelzkurven-Peak und der Temperaturunterschied zwischen den Proben sprechen für ein einheitliches Produkt der Primer. Das gewählte Design scheint damit geeignet.

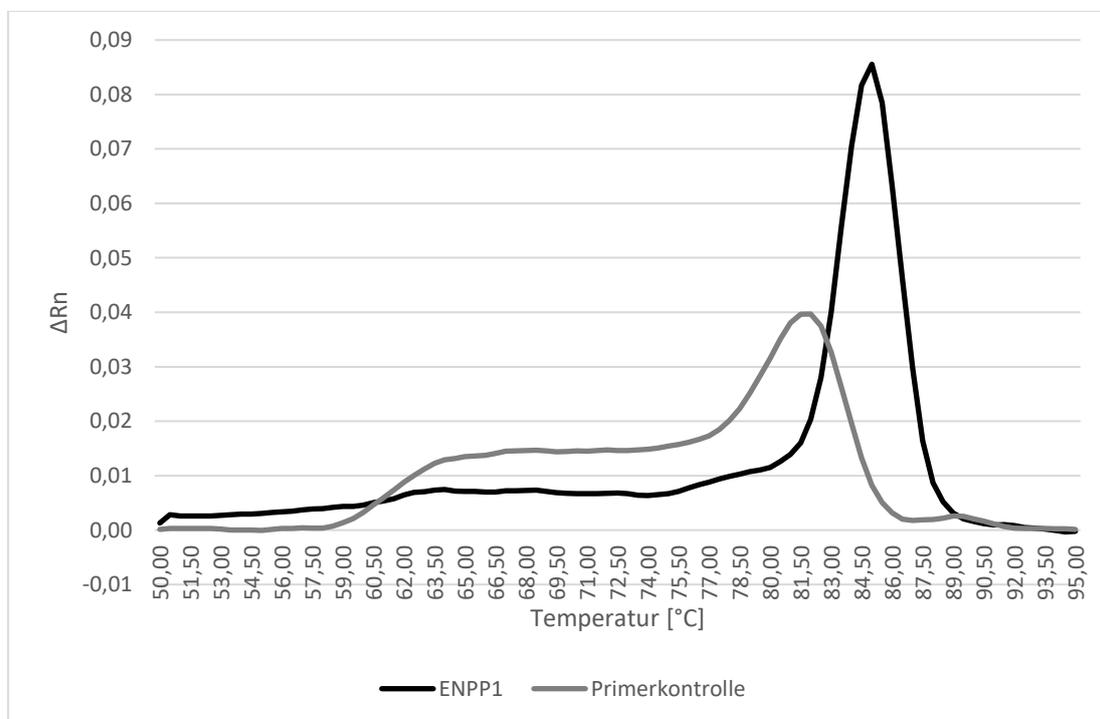


Abbildung 6 Schmelzkurve für ENPP1

Schmelzkurven für ENPP1 unter Verwendung von cDNA aus Ins-1 832/13-Zellen und einer Negativkontrolle.

Unter Berücksichtigung derselben Vorgaben wurde auch ein passendes Primerpaar für FBP1 generiert. Die Primer wurden in einer qRT-PCR hinsichtlich ihrer Eignung untersucht. Zur Abschätzung von Primer-Dimeren wurden Proben ohne cDNA-Matrize als Negativkontrolle verwendet. Aufgrund der in Abbildung 7 gezeigten Schmelzkurve mit mehreren Peaks konnte nicht von einer ausreichenden Spezifität der Primer ausgegangen werden. Der zweite Peak lässt ein weiteres Produkt neben dem eigentlichen Amplifikat vermuten. Auch der geringe Unterschied in den Maxima der Kurven von Probe und Kontrolle könnte auf Primer-Dimere hindeuten. Aufgrund dieser Ergebnisse musste ein neues Primerpaar entworfen werden.

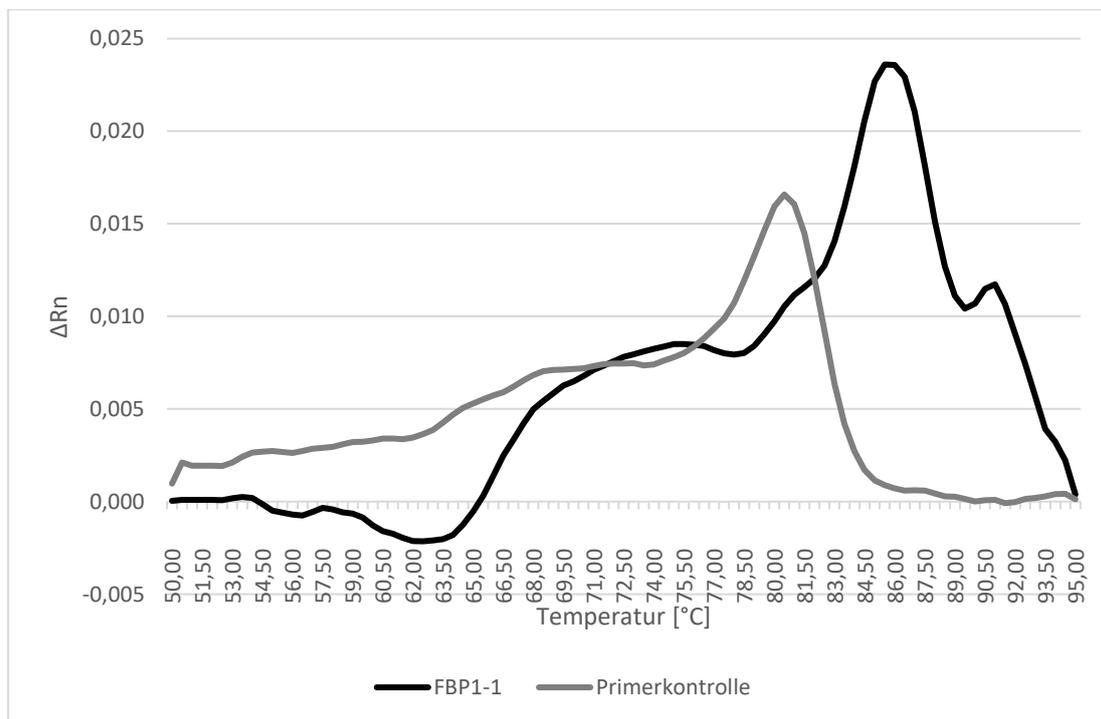


Abbildung 7 Schmelzkurve für FBP1-1

Schmelzkurven für FBP1 unter Verwendung von cDNA aus Ins-1 832/13-Zellen und einer Negativkontrolle.

Durch Anpassungen der Sequenzlänge und Wahl eines alternativen Exon-Intron-Überganges innerhalb der Nukleinsäuresequenz von FBP1 ergab sich ein neues Primerpaar. Die in Abbildung 8 gezeigte Schmelzkurve weist einen geeigneten Peak auf. Jedoch ist der Peak der Kontrolle ohne DNA-Matrize deutlich erhöht, was für Dimere der Primer sprechen könnte. Aufgrund dieser Ergebnisse ist das Primerpaar ebenfalls nicht für die Untersuchungen an FBP1 geeignet.

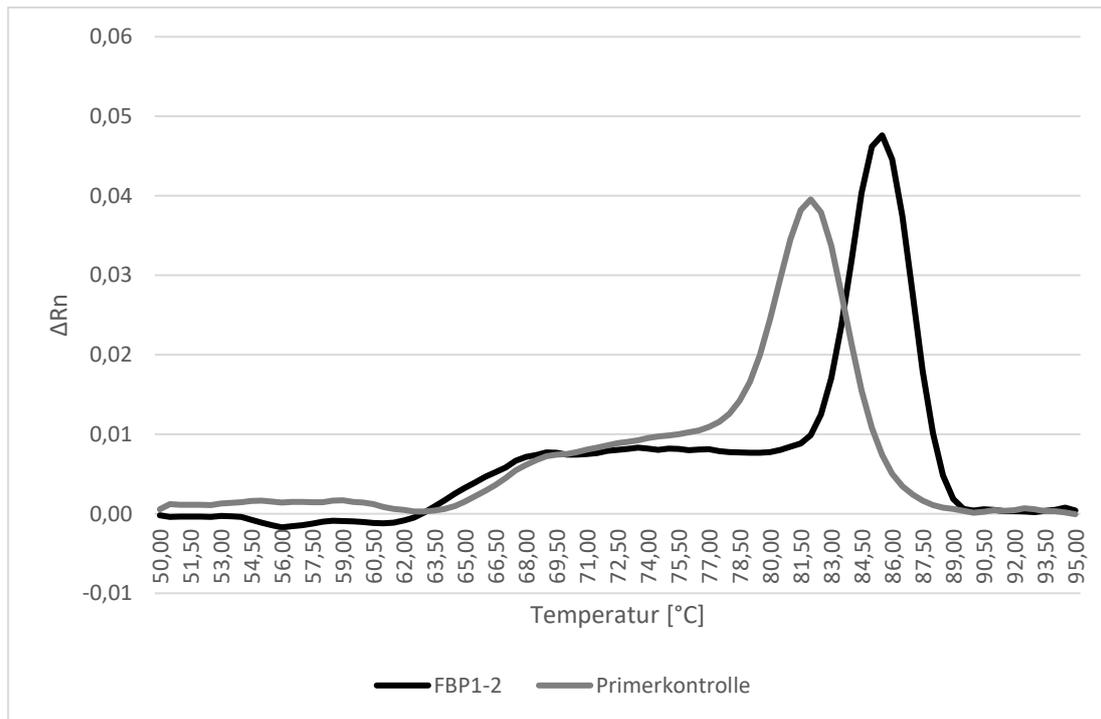


Abbildung 8 Schmelzkurve für FBP1-2

Schmelzkurven für FBP1 unter Verwendung von cDNA aus Ins-1 832/13-Zellen und einer Negativkontrolle.

Durch weiteres Modifizieren der Primerlänge und Überspannen eines alternativen Exon-Intron-Überganges wurde ein neues Design eines FBP1-Primerpaars generiert. Unter Berücksichtigung der weiterhin gültigen Anforderungen ergaben sich die Primer FBP1 (forward) *GCTTCATGCTGGACCCGTCCATTGGAG* und FBP1 (reverse) *GGACCCACATACCGGGCAC*. Die Annealing-Temperatur des Paares lag mit 60,3°C innerhalb der Vorgaben des verwendeten ORA™ qPCR Green ROX L Mix. Unter Verwendung von INS-1 832/13 cDNA und einer Kontrolle ohne DNA-Matrize ergab sich die in Abbildung 9 dargestellte Schmelzkurve. Die Plateaubildung vor dem Peak ist im Vergleich zum eigentlichen Kurvenmaximum gering und damit irrelevant. In Zusammenschau mit der Kontrollkurve, welche sich in Temperatur und Höhe deutlich unterscheidet, scheint das Primerpaar für weiterführende Untersuchungen an FBP1 geeignet. In allen weiteren Experimenten wurden daher die Primer ENPP1 und FBP1-3, folgend als FBP1 bezeichnet, verwendet.

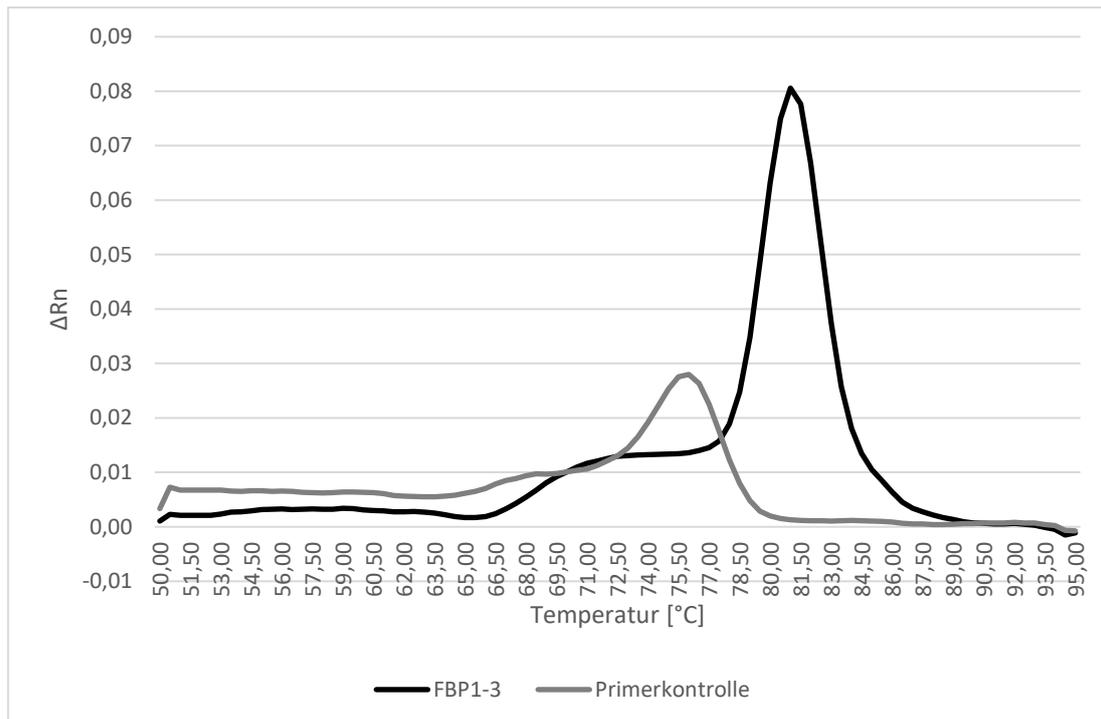


Abbildung 9 Schmelzkurve für FBP1-3

Schmelzkurven für FBP1 unter Verwendung von cDNA aus Ins-1 832/13-Zellen und einer Negativkontrolle.

5.3 mRNA-Expression von ENPP1 und FBP1 nach CK2-Hemmung in INS-1 832/13

Es stellte sich die Frage, ob eine Hemmung der CK2-Kinaseaktivität durch den Hemmstoff CX-4945 eine messbare Veränderung des mRNA-Gehalts der Proben bewirken könne.

Hierfür wurden die Proben eingesetzt, welche zuvor zur Genexpressionanalyse im qRT-PCR-Array verwendet und von M. Völcker dankenswerterweise zur Weiterverwendung freigegeben wurden. Dabei handelt es sich um INS-1 832/13-Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit 10 μ M CX-4945, bzw. DMSO.

Die Proben wurden in einem ersten Schritt mittels cDNA-Synthese-Kit in cDNA umgeschrieben und anschließend der qRT-PCR zugeführt.

In drei unabhängigen Experimenten wurde die mRNA-Menge der Zielgene mit denen der Kontrollgene ACTB (β -Aktin) und HPRT1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) jeden Experiments verglichen. Aufgrund ihrer ausreichend hohen Expression in pankreatischem

Gewebe und der geringen Variabilität innerhalb der Proben wurden diese als Housekeeping-Gene verwendet.

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen dabei jeweils exemplarisch Amplifikationskurven aus den Versuchsreihen von ENPP1 und FBP1 nach 24-stündiger Behandlung mit 10 μ M CX-4945 bzw. DMSO. Ebenfalls abgebildet ist eine Negativkontrolle ohne DNA-Template. In beiden Abbildungen ist erkennbar, dass die DMSO-Proben einen jeweils niedrigeren CT-Wert aufweisen als die korrespondierende CX-4945-Probe. Diese Ergebnisse sprechen für eine geringere Menge cDNA in den CX-4945-Proben.

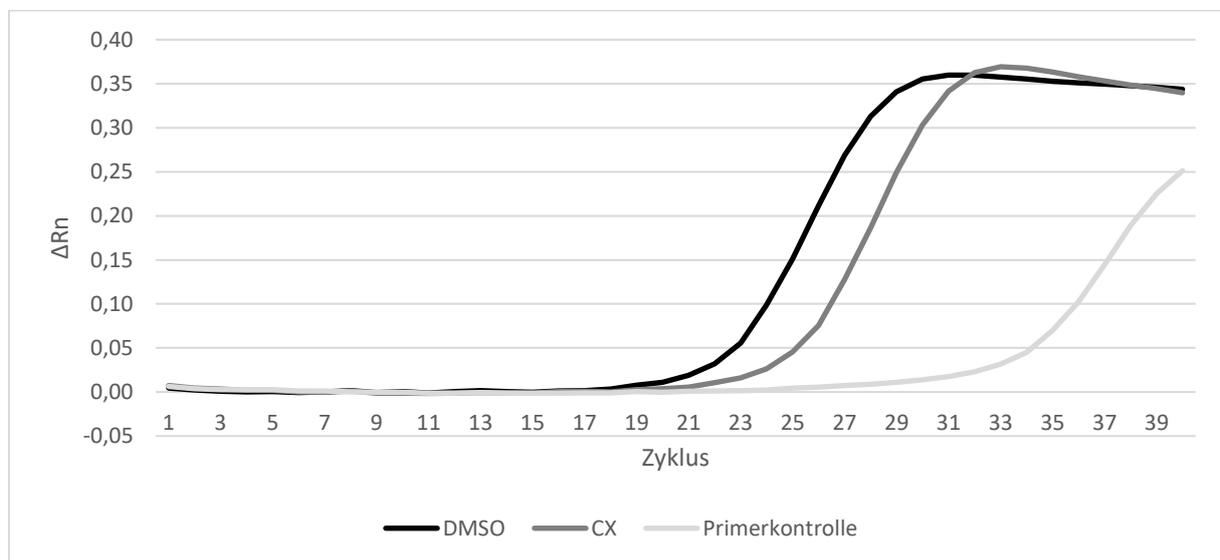


Abbildung 10 Amplifikationskurve für ENPP1

INS-1 832/13-Zellen wurden mit 10 μ M CX-4945 bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 24 Stunden behandelt. Nach der RNA-Extraktion wurde je 1 μ g Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend zur Quantifizierung der Genexpression einer qRT-PCR zugeführt. Die Amplifikationskurve gibt dabei die jeweiligen Werte der CX-4945 Probe bzw. DMSO-Kontrolle, sowie einer Negativkontrolle ohne DNA-Matrize wieder.

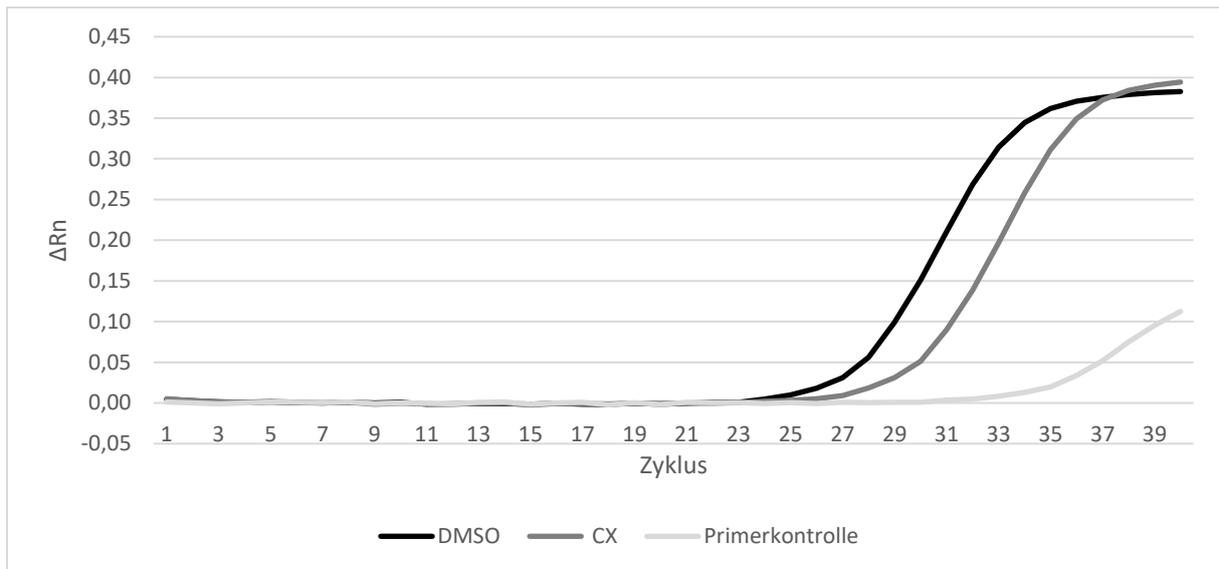


Abbildung 11 Amplifikationskurve für FBP1

INS-1 832/13-Zellen wurden mit 10 μM CX-4945 bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 24 Stunden behandelt. Nach der RNA-Extraktion wurde je 1 μg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend zur Quantifizierung der Genexpression einer qRT-PCR zugeführt. Die Amplifikationskurve gibt dabei die jeweiligen Werte der CX-4945 Probe bzw. DMSO-Kontrolle, sowie einer Negativkontrolle ohne DNA-Matrize wieder.

Aus den resultierenden CT-Werten der qRT-PCR wurden, wie in der Methodik beschrieben (siehe 4.1.4), die Änderungen der Genexpression berechnet. Entsprechende Ergebnisse wurden in Tabelle 11 dargestellt. Hierfür wurden die jeweiligen Werte der beiden Zielgene ENPP1 und FBP1 auf die Housekeeping-Gene ACTB und HPRT1 normiert. Die mit CX-4945 behandelten Proben wurden auf die Kontrollgruppe mit DMSO-Behandlung normiert.

Tabelle 11 qRT-PCR Ergebnisse zum Fold Down von ENPP1 und FBP1 in INS-1 832/13

	Fold Change	P-Wert	Fold Down
ENPP1	0.34	0.003815	-2.91
	0.37	0.000106	-2.7
	0.56	0.005674	-1.79
FBP1	0.41	0.003381	-2.42
	0.64	0.183716	-1.55
	0.63	0.000935	-1.58

Die in der Tabelle 11 aufgeführten Werte sind jeweils biologische Replikate aus je drei technischen Replikaten gemittelt. Die erhobenen Werte zur Herunterregulation (*Fold Down*) von ENPP1 und FBP1 sind in der folgenden Abbildung 12 graphisch dargestellt.

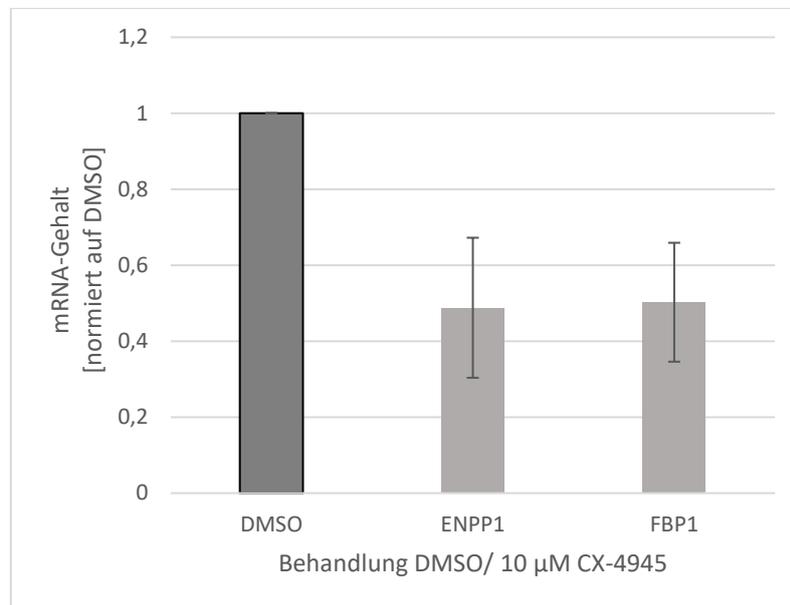


Abbildung 12 qRT-PCR Ergebnisse zum mRNA-Gehalt der Zielgene ENPP1 und FBP1

INS-1 832/13-Zellen wurden 24 Stunden mit 10 μM CX, bzw. DMSO behandelt und anschließend der RNA-Extraktion zugeführt. Jeweils 1 μg Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und als Template für die qRT-PCR genutzt. Das dargestellte Diagramm zeigt den Mittelwert von jeweils mindestens 3 biologischen Replikaten, welche pro Testung als technisches Triplet durchgeführt wurden. Der errechnete Wert für FBP1 und ENPP1 wird auf die Kontrollreihe DMSO normiert und zeigt durch Anwendung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode den „Fold Change“ der einzelnen Gene.

Abbildung 12 zeigt eine deutliche Herunterregulation der mRNA-Expression nach Hemmung der CK2-Aktivität in den INS-1 832/13. Im nächsten Schritt war es wichtig zu wissen, ob sich die Abnahme des mRNA-Gehaltes auch auf Proteinebene widerspiegelt.

5.4 Proteinnachweis von ENPP1 und FBP1 in INS-1 832/13

Für den Proteinnachweis wurden zunächst Ins-1 832/13-Zellen unbehandelt geerntet und Zellextrakte hergestellt. Als Positivkontrolle wurde Lebergewebe aus der Ratte und die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 unter gleichen Bedingungen aufgeschlossen. MCF-7 weist eine verhältnismäßig hohe FBP1-Expression auf, was sowohl im Datenblatt des Antikörpers D2T7F als auch in der Literatur so beschrieben ist [28]. Die Proben wurden auf ein 10%, bzw.

12.5% Gel aufgetragen. Es folgte eine Western-Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin nachgewiesen.

Unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers FBP1 und des polyklonalen ENPP1 Antikörpers gelang der Proteinnachweis in INS-1 832/13 nicht. Der Abbildung 13 ist zu entnehmen, dass im Lebergewebe ENPP1- und FBP1-Protein nachweisbar ist, jedoch nicht in unbehandelten INS-1 832/13 Zellen.

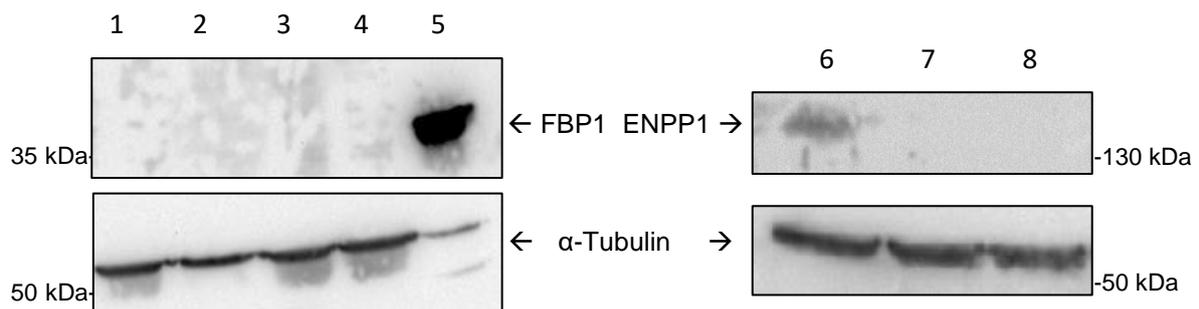


Abbildung 13 Western Blot-Analyse zur Expression von ENPP1 und FBP1 in INS-1 832/13

Für den Nachweis von FBP1 wurden je 50 μ g Zellextrakt 10 μ M CX-4945 (Proben Nr.2,4), bzw. DMSO (Proben Nr.1,3) behandelte INS-1 832/13-Zellen und 30 μ g MCF-7 (Proben Nr.5) Zellextrakt auf ein 12.5% Gel geladen. Der Blot auf eine PVDF-Membran erfolgte über Nacht. Als Ladekontrolle diente eine zweite Inkubation mit dem Nachweis von α -Tubulin.

Zum Nachweis von ENPP1 wurden 50 μ g Zellextrakt unbehandelter INS-1 823/13 (Proben Nr.7/8), sowie homogenisiertes Lebergewebe (Proben Nr.6) auf ein 12.5% Gel geladen. Die Ladekontrolle erfolgte ebenfalls mittels Detektion von α -Tubulin.

Sowohl die Ladekontrolle mit α -Tubulin als auch die Kontrollprobe mit Lebergewebe deuten nicht auf einen technischen Fehler der Methodik oder Versagen des Antikörpers hin. Möglich schien eine nicht ausreichende Expression der Proteine in den INS-1 Zellen bei ausreichenden Proteinmengen in Lebergewebe.

Da sowohl ENPP1, als auch das Gluconeogenese-Enzym FBP1 in Lebergewebe exprimiert wird, schien es naheliegend, die Untersuchung beider Proteine an Leberzellen durchzuführen. [106] [14].

5.5 Etablierung eines neuen Modellsystems

Die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Experiment lassen auf eine Expression beider Proteine in Lebergewebe schließen. Daher wurden für weitere Untersuchungen die Rattenhepatomzellen McA-RH7777 etabliert.

Die Hellfeldaufnahme zeigt das Wachstum der McA-RH7777-Zellen, die teils adhären in Verbänden gruppiert stehen.

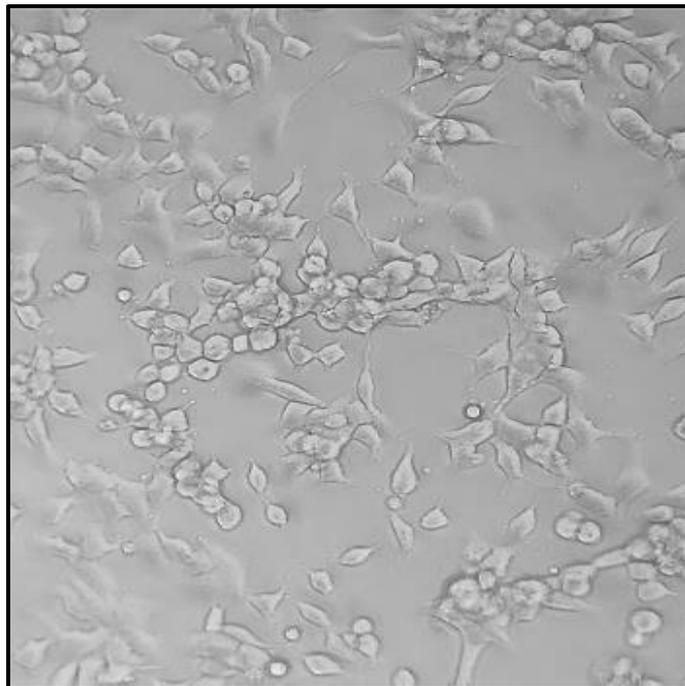


Abbildung 14 McA-RH7777 Hellfeldaufnahme bei 200x Vergrößerung

Aufnahme von teils adhärenen McA-RH7777-Zellverbänden mit einem Leica DM IL 450 Mikroskop

5.6 Biochemischer Nachweis der CK2-Untereinheiten in McA-RH7777

Zuerst wurde überprüft, ob mit spezifischen Antikörpern die CK2-Untereinheiten in der Zelllinie MCA-RH7777 nachweisbar sind.

Hierfür wurden Gesamtzellextrakte der mit 10 μ M CX-4945, bzw. DMSO behandelten McA-RH7777-Zellen aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Proteine der CK2-Untereinheiten wurden mit den monoklonalen Mausantikörpern 1A5 (CK2 α) und sc-46666 (CK2 β), sowie dem polyklonalen Kaninchenserum #30 (CK2 α') nachgewiesen. Zum Nachweis von Ladekontrollen diente der polyklonale Ziegenantikörper sc-1616 (Actin) und der monoklonale Mausantikörper T9026 (α -Tubulin).

Die nachfolgend dargestellten Blots erbringen den Nachweis der CK2-Untereinheiten in McA-RH7777-Zellen.

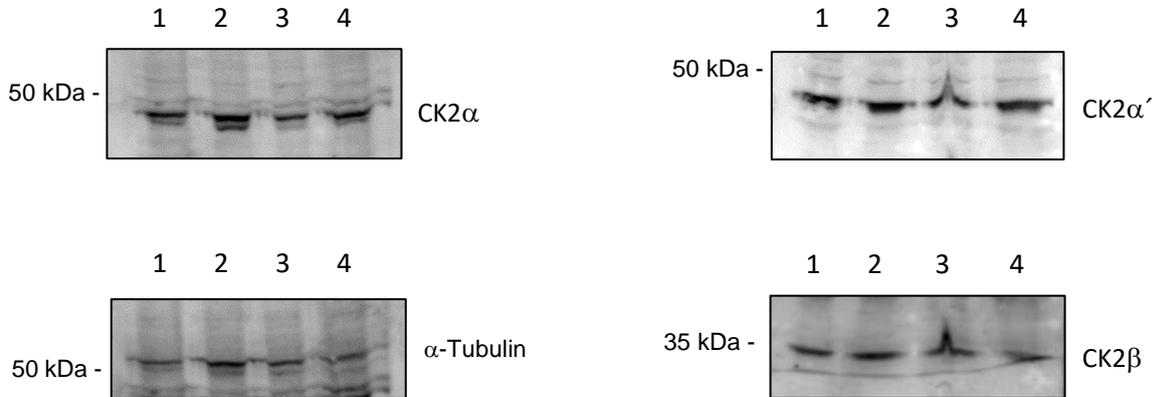


Abbildung 15 Western Blot Analyse zum Nachweis der CK2-Untereinheiten in McA-RH7777

Die einzelnen Blots zeigen den Nachweis der CK2-Untereinheiten in McA-RH7777-Zellen. Eingesetzt wurden dabei jeweils zwei Proben mit 10 μ M CX-4945 (Proben Nr.2,4), bzw. DMSO (Proben Nr.1,3) behandelt. Je 50 μ g Zellextrakt wurden beidseits des Markers auf ein 12.5% Gel aufgetragen. Nach dem Blot auf eine PVDF-Membran über Nacht wurde die Membran am Marker geteilt und anschließend mittels angegebenen Antikörpern die entsprechenden Proteine detektiert.

Da in den McA-RH7777-Zellen die CK2-Untereinheiten nachzuweisen sind, sollte im folgenden Schritt die Auswirkung einer Hemmung der CK2 mittels CX-4945 untersucht werden.

5.7 Bestimmung der CK2-Kinaseaktivität nach Hemmung

Zum Nachweis der CK2-Hemmung durch den eingesetzten Hemmstoff CX-4945 wurde die CK2-Aktivität der entsprechenden Proben gemessen. Dazu wurde in Abbildung 16 die gemessene CK2-Aktivität der CX-4945-Proben auf die ermittelten Werte der DMSO-Probe normiert. Im Vergleich zur Kontrolle fiel die CK2-Aktivität der CX-4945 behandelten Proben auf unter 33% der DMSO-Proben ab. Aufgrund der erhobenen Daten ist von einer wirkungsvollen Hemmung der CK2-Aktivität durch die gewählte Hemmstoffkonzentration von 10 μ M CX-4945 auszugehen.

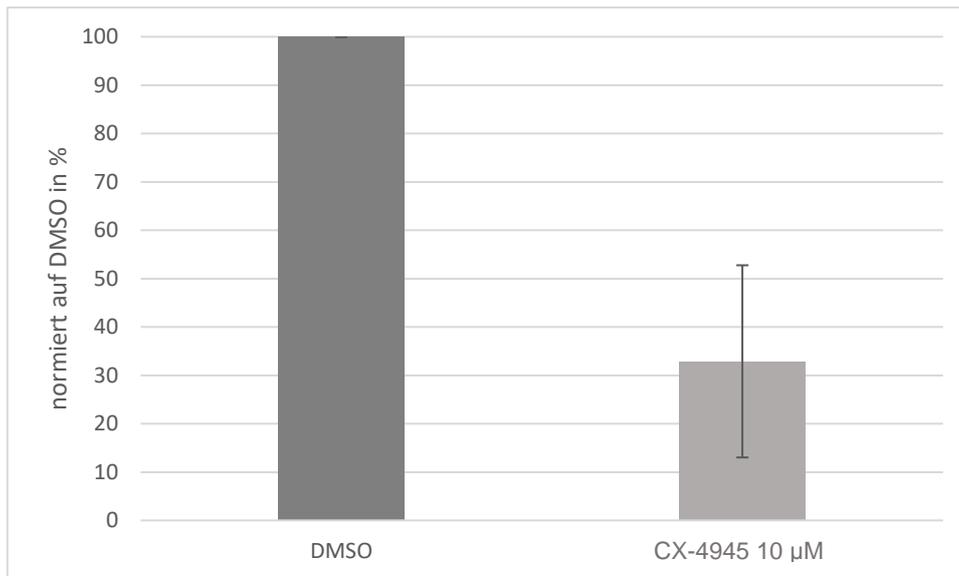


Abbildung 16 In vitro CK2-Kinaseaktivitätsanalyse der CK2-Aktivität in McA-RH7777 nach Hemmung mit CX-4945

Die Abbildung zeigt das Ergebnis aus drei unabhängigen Passagen der Zelllinie. McA-RH7777-Zellen wurden über 24 Stunden mit 10 µM CX-4945 bzw. DMSO behandelt, anschließend geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Hiervon wurden je 10 µg zur CK2-Kinaseaktivitätsmessung verwendet. Die Messung fand mit Doppelwerten der jeweiligen Probe statt.

5.8 Überprüfung der CK2-Hemmstoffbedingungen für McA-RH7777

Welche Auswirkungen die in vorausgegangen Experimenten gewählten Hemmstoffkonzentrationen auf die Hepatomzellen haben können, musste in nachfolgenden Experimenten zur Zytotoxizität und Zellviabilität untersucht werden.

Hierzu wurde mithilfe des *Cytotoxicity Detection* Kit von Roche eine Messung der Lactatdehydrogenase-Aktivität durchgeführt. Lactatdehydrogenase wird von geschädigten Zellen aus dem Zytosol freigesetzt und gibt Aufschluss über den mediatorvermittelten Zelltod.

Dazu wurde 24 Stunden vor der Zellbehandlung 1×10^4 Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Am Folgetag wurde den adhären Zellen CX-4945 und DMSO in verschiedenen Konzentrationen zugefügt. Nach 24 Stunden erfolgte die Messung nach Vorgaben des Herstellers.

Im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen zeigten die mit dem CK2-Hemmstoff CX-4945 behandelten Zellen keine gesteigerte LDH-Freisetzung.

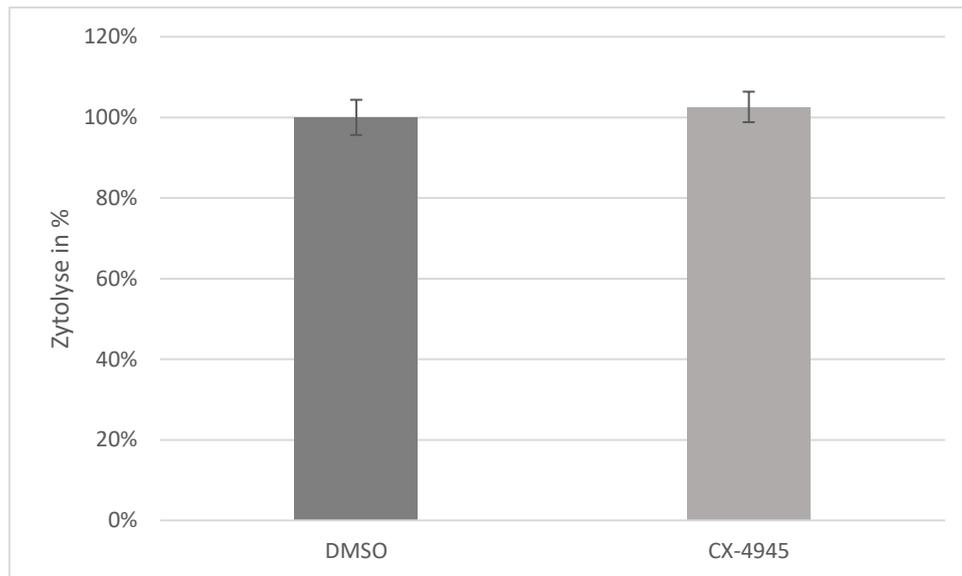


Abbildung 17 Quantifizierung der Zytolyse mittels Cytotoxicity Detection Kit

McA-RH7777-Zellen wurden auf einer 96Well-Platte ausgesät und 24 Stunden mit 10 μ M CX-4945 oder DMSO behandelt. Durch die Messung der LDH-Aktivität mittels dem Kit können Rückschlüsse auf die Zytotoxizität der eingesetzten Mengen an CX-4945 und DMSO gezogen werden.

Bezüglich der Hemmstoffkonzentration und damit einhergehender Effekte auf die McA-RH7777-Zellen ist die alleinige Quantifizierung der Zytolyse nicht ausreichend.

Für Rückschlüsse auf die Zellproliferation und Zellviabilität wurde eine WST-1-Testung vorgenommen.

An der Zelloberfläche wird das Tetrazoliumsalz WST-1 von vitalen Zellen durch eine Spaltung in ein lösliches Formazan umgesetzt. Maßgeblich für diese Bioreduktion ist NAD(P)H, welches auf glykolytischem Wege von stoffwechselaktiven Zellen produziert wird. Über die gebildete Menge an Farbstoff lassen sich Rückschlüsse auf die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen ziehen.

Zur Testung wurden die gleichen Mengen DMSO und CX-4945 eingesetzt, wie schon zuvor im *Cytotoxicity Detection* Kit. Das verwendete WST-1 Assay wurde nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Die in Abbildung 18 gezeigten Ergebnisse der Viabilitätsbestimmung gaben für die eingesetzte Konzentration CX-4945 keinen Hinweis auf eine signifikante Beeinflussung der Zellviabilität durch den Hemmstoff.

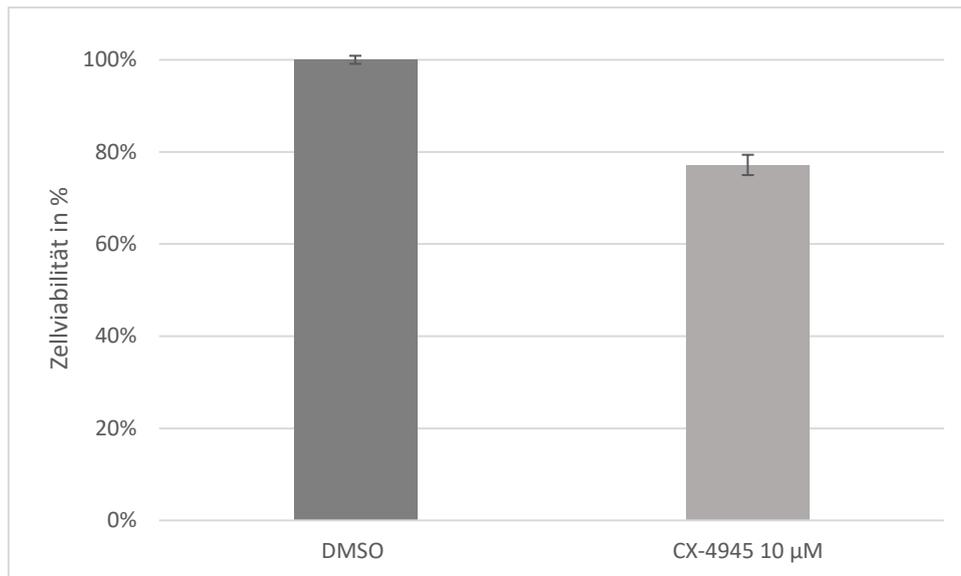


Abbildung 18 Quantifizierung der Zellproliferation und Zellviabilität mittels WST-1 Testung

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden McA-RH7777-Zellen auf einer 96-Well-Platte ausgesät und für den Versuch 24 Stunden mit 10 µM CX-4945, bzw. DMSO behandelt. Nach 4 Stunden Inkubationszeit mit der Kit-Reagenz erfolgte die Messung des entstandenen Farbstoffes im Spektral-Photometer. Der Cytotoxicity Detection ähnelnd, wird bei dieser Bioreduktion das stabile Tetrazoliumsalz WST-1 verwendet.

Die durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich einer verwendeten CX-4945-Konzentration von 10 µM lieferten keinen Anhaltspunkt, dass diese Konzentration des Hemmstoffes ungeeignet wäre.

Zusammenfassend scheint die gewählte Hemmstoffkonzentration von 10 µM CX-4945 unbedenklich für die Viabilität der McA-RH7777-Zellen und dennoch ausreichend für eine effektive Hemmung der CK2-Kinaseaktivität. Auf dieser Grundlage konnten, analog den Untersuchungen an INS-1 832/13, die Experimente mit der Zelllinie McA-RH7777 durchgeführt werden.

5.9 mRNA-Expression von ENPP1 und FBP1 nach CK2-Hemmung in McA-RH7777

Zur Bestimmung der mRNA-Expression in McA-RH7777-Zellen wurde eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden Rattenhepatomzellen für 24 h mit 10 µM CX-4945 bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt und einer RNA-Extraktion unterzogen. Nach Umschreibung in cDNA wurden die Proben als technische Triplikate zur qRT-PCR verwendet und der jeweilige *Fold Down* berechnet. Die Abbildungen 19 und 20 zeigen dabei exemplarisch Amplifikationskurven von ENPP1 und FBP1. Die Ct-Werte der CX-4945-Probe liegen jeweils höher als die Werte der DMSO-Kontrollen. Die Ausgangsproben enthielten somit weniger

cDNA nach Behandlung mit dem Hemmstoff CX-4945. Da die Primerkontrollen ohne DNA-Template erst deutlich später den Schwellwert passieren, ist eine Verunreinigung der Proben mit Fremdmaterial oder etwaige Dimerbildung eher unwahrscheinlich. Dieser Effekt der CK2-Aktivitätshemmung auf die Genexpression von ENPP1 und FBP1 war zuvor schon in den INS-1 832/13 zu beobachten.

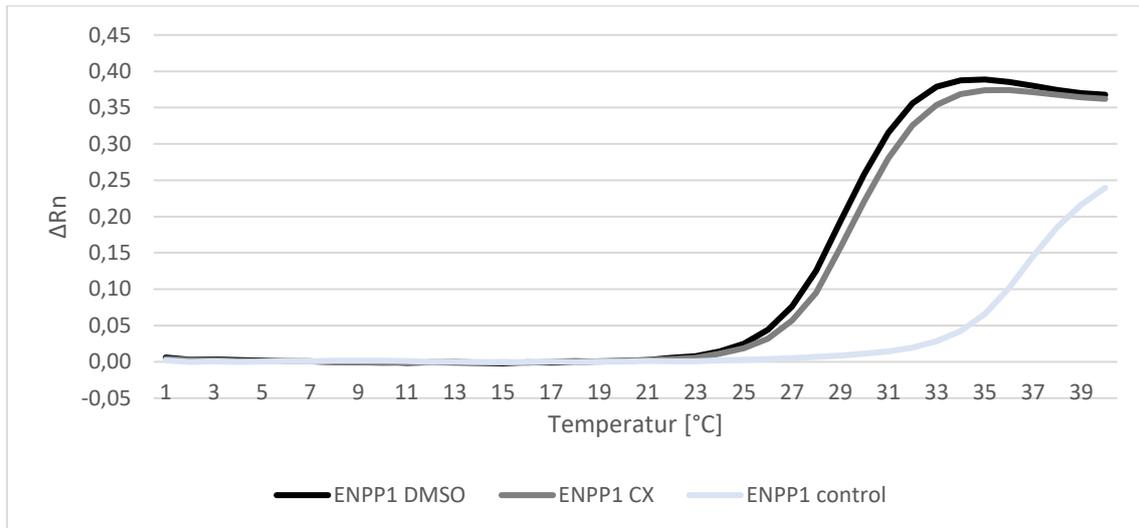


Abbildung 19 Amplifikationskurve für ENPP1

McA-RH7777-Zellen wurden mit 10 μ M CX-4945 bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 24 Stunden behandelt. Nach der RNA-Extraktion wurden je 1 μ g Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend zur Quantifizierung der Genexpression einer qRT-PCR zugeführt. Die Amplifikationskurve gibt dabei die jeweiligen Werte der CX-4945 Probe bzw. DMSO-Kontrolle, sowie einer Negativkontrolle ohne DNA-Template wieder.

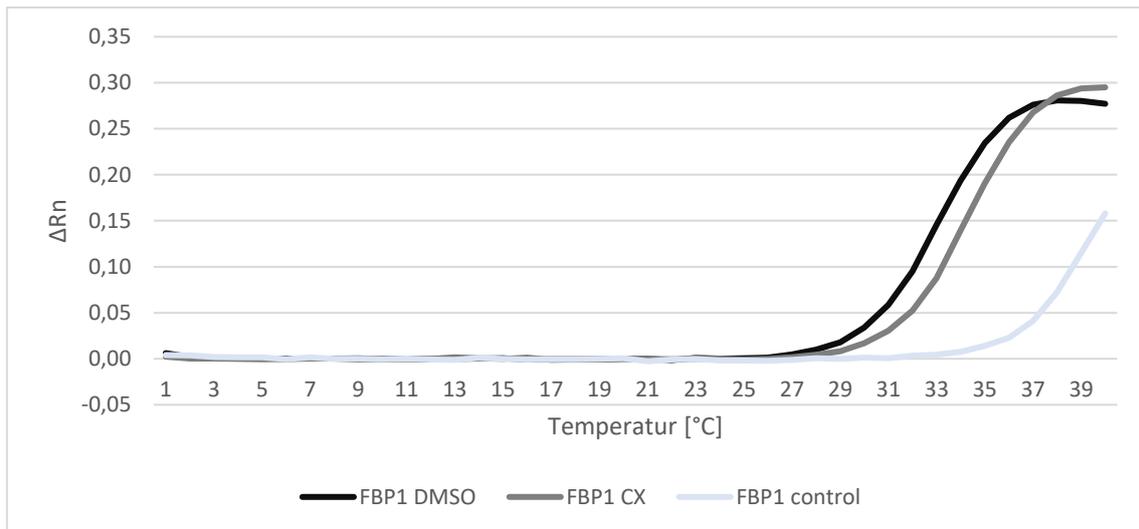


Abbildung 20 Amplifikationskurve für FBP1

McA-RH7777-Zellen wurden mit 10 μ M CX-4945 bzw. mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 24 Stunden behandelt. Nach der RNA-Extraktion wurden je 1 μ g Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend zur Quantifizierung der Genexpression einer qRT-PCR zugeführt. Die Amplifikationskurve gibt dabei die jeweiligen Werte der CX-4945 Probe bzw. DMSO-Kontrolle, sowie einer Negativkontrolle ohne DNA-Template wieder

Die ermittelten Ct-Werte der qRT-PCR-Analyse flossen in die Tabelle 12 mit ein. Diese dient der Darstellung der X-fachen Regulation von ENPP1 und FBP1 nach Hemmung der CK2 in McA-RH777-Zellen.

Tabelle 12 qRT-PCR Ergebnisse zum Fold Down von ENPP1 und FBP1 in McA-RH7777

	Fold Change	P-Wert	Fold Down
ENPP1	0.71	0.180518	-1.41
FBP1	0.52	0.000442	-1.92

Die Analyse der mRNA-Expression von FBP1 in MCA-RH7777-Zellen wies eine annähernd zweifache (1.92 x) Herunterregulation unter Hemmung der CK2 mittels CX-4945 auf.

Die Ergebnisse mussten in einem folgenden Schritt auf Proteinebene untersucht werden.

5.10 Proteinnachweis von ENPP1 und FBP1 in McA-RH7777

Ob die Ergebnisse der mRNA-Expression ebenfalls auf die Proteinbiosynthese von ENPP1 und FBP1 zutreffend sind, sollte der Nachweis der Proteine liefern.

Hierzu wurden Proben zweier McA-RH7777-Zellpassagen für 24 h mit 10 μ M CX-4945 und DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und zu Gesamtzellextrakten verarbeitet. Jeweils 25 oder 50 μ g pro Extrakt wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgte der anschließende Nachweis mit dem polyklonalen Antikörper L520 für ENPP1. Als Ladekontrolle wurde der polyklonale Ziegenantikörper sc-1616 für Actin verwendet.

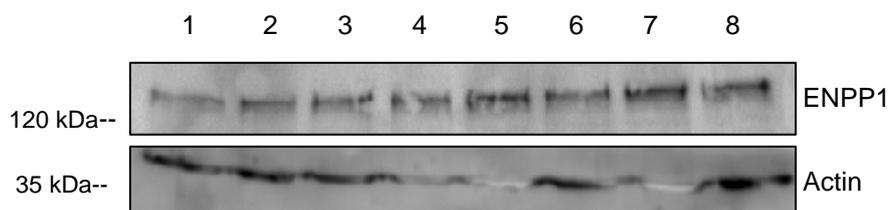


Abbildung 21 Western Blot Analyse zur Expression von ENPP1 in McA-RH7777 nach Behandlung mit CX-4945

Die Quantifizierung der CX-4945/DMSO-Proben erfolgt mittels Bestimmung der Spitzenintensität. Dabei stehen die Nummern 1-4 für 25 μ g (Proben Nr.1,3) und 50 μ g (Proben Nr.2,4) Gesamtzellextrakt der mit 10 μ M CX-4945 behandelten Zellen. Die Nummern 5,8 codieren für jeweils 50 μ g (Proben Nr.5,7) und 25 μ g (Proben Nr.6,8) Zellextrakt der Kontrolle mit DMSO. Mit dem spezifischen Antikörper ENPP1 erfolgte der Proteinnachweis. Actin diente als Ladekontrolle und floss mit in die Berechnung der Intensität ein.

Bei der quantitativen Bestimmung der einzelnen Banden wurden bis auf das korrespondierende Probenpaar 4,7 alle weiteren Paare ausgewertet und zur Quantifizierung berücksichtigt. Dabei ergab sich unter Berücksichtigung der Ladekontrolle Actin aus den zwei technischen, bzw. biologischen Replikaten, eine 0.67x-fache Herunterregulation für ENPP1 nach CK2-Hemmung durch CX-4945.

Da die qRT-PCR-Ergebnisse auch für FBP1 eine deutliche Herunterregulation zeigten, galt es, den Nachweis des Proteins in den Hepatomzellen zu erbringen.

Jedoch war dies unter den Standardbedingungen nicht erfolgreich. Der untenstehende Blot (Abb. 22) zeigt McA-RH7777-Gesamtzellextrakt, welcher nach der Inkubation mit dem FBP1-Antikörper nur eine positive Kontrolle für den eingesetzten MCF-7-Extrakt aufzeigt. Vom Gesamtzellextrakt der Lebertumorzellen kamen jeweils 100 μ g Gesamtprotein zum Einsatz.

Die im Folgenden dargestellte Western Blot Analyse wurde mit 50 μ g MCF-7-Gesamtzellextrakt durchgeführt.

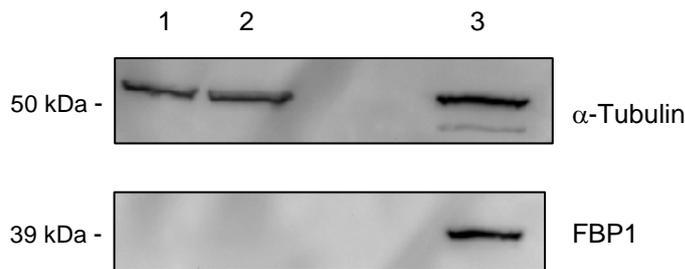


Abbildung 22 Western Blot Analyse zur Expression von FBP1 in McA-RH7777- und MCF-7-Zellen

Nach Herstellung der Gesamtzellextrakte wurden davon jeweils 100 μ g McA-RH7777 (Proben Nr.1,2), sowie 50 μ g MCF-7 (Proben Nr.3) auf ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Blot auf eine PVDF-Membran erfolgte mithilfe des monoklonalen Antikörpers D2T7F die Detektion nach FBP1. Durch den monoklonalen Mausantikörper T9026 wurde anschließend α -Tubulin detektiert.

Das Fehlen der FBP1 in McA-RH7777 wäre dadurch erklärbar, dass aufgrund der Zellkulturbedingungen und dem Einsatz von DMEM mit Glucose die Zelle nicht auf eine Neusynthese der Glucose angewiesen ist. Um diese metabolische Situation zu erzwingen, wurden Wachstumsbedingungen der Zellen in Kultur angepasst und die Gluconeogenese pharmakologisch induziert.

Hierfür wurden die Zellen 24 Stunden auf DMEM mit Zusatz von 1000 mg/L Glucose umgestellt.

Für die letzten 2 Stunden vor der Zellernte folgt eine weitere Modifikation des Kulturmediums mit dem Einsatz eines Gluconeogenese-Mediums. Hierbei handelt es sich um einen angepassten, glucosefreien Krebs-Ringer-Puffer mit zusätzlichen 10 mM Lactat und 2 μ M Forskolin. Durch die Verwendung von Forskolin und Lactat kommt es zur Stimulierung der Gluconeogenese [60,67]. Der Einsatz von modifiziertem Krebs-Ringer-Puffer entstammt dabei dem Protokoll des Glucose-Glo™ Assay von Promega und wird zur Stimulierung der Gluconeogenese bei kultivierten humanen Hepatozyten verwendet.

Der nachfolgende Western Blot wurde mit Gesamtzellextrakten angefertigt, welche unter den gluconeogenetischen Bedingungen kultiviert wurden. Anschließend wurden 100 μ g der Extrakte über ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem monoklonalen FBP1-Antikörper detektiert. Als Kontrolle diente hierbei erneut eine Probe von 30 μ g MCF-7.

Jedoch führten auch die neugeschaffenen Kulturbedingungen nicht zum Nachweis von FBP1 auf Proteinebene.

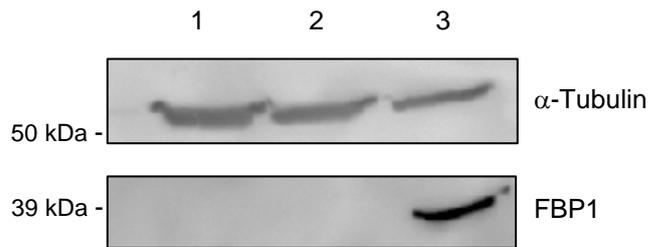


Abbildung 23 Western Blot Analyse zur Expression von FBP1 in gluconeogenetisch optimierten McA-RH7777

Nach Herstellung der Gesamtzellextrakte wurden davon jeweils 100 µg der McA-RH7777-Zellen (Proben Nr. 1,2) und 50 µg MCF-7 (Proben Nr.3) als Kontrolle auf ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Blot auf eine PVDF-Membran erfolgte mithilfe eines monoklonalen Antikörpers die Detektion der FBP1. Durch den monoklonalen Mausantikörper T9026 wurde anschließend α-Tubulin detektiert.

Weitere Anpassungen der Kulturbedingungen und Modifikationen an der Zusammensetzung des KRP ergaben keine Proteinbanden für FBP1 in den Hepatomzellen. Dabei wurde die Konzentrationen des hinzugefügten Lactat und Forskolin schrittweise bis auf 20 mM, bzw. 20 µM erhöht. Der ausbleibende Nachweis der FBP1 nach Hemmung mit CX-4945 war die Grundlage dafür, dass eine alternative Herunterregulation der CK2 womöglich zielführend sein könnte.

5.11 Knock-down der Proteinkinase CK2

Obwohl CX-4945 ein recht selektiver Hemmstoff für CK2 ist, sind *off-target*-Effekte bekannt [86,91]. Um diese Effekte weitestgehend ausschließen zu können, wurde in den folgenden Experimenten die CK2-Herunterregulation mittels Transfektion von spezifischer siRNA vorgenommen und deren Einfluss auf die Expression von FBP1 analysiert.

Hierzu wurden McA-RH7777-Zellen mit Kontroll-siRNA und siRNA gegen CK2α/α' transfiziert und nach 24 Stunden geerntet.

Die daraus hergestellten Gesamtzellextrakte wurden mittels Western Blot-Analysen auf eine Herunterregulation der CK2-Untereinheiten überprüft.

Dazu wurden je 50 µg des Gesamtproteins der Kontroll-siRNA und der CK2α/α' siRNA über einem 12.5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch den monoklonalen Mausantikörper 1A5 wurde CK2α detektiert, während das polyklonale Kaninchenserum #30 zum Nachweis von CK2α' verwendet wurde. Wie in Abbildung 24 gezeigt, konnte die Expression der beiden Untereinheiten im Vergleich zu Kontrollzellen in den mit CK2α/α' siRNA transfizierten Zellen deutlich reduziert werden.

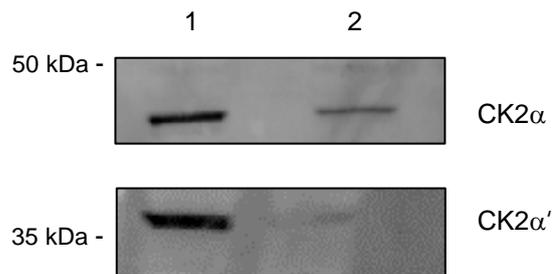


Abbildung 24 Western Blot Analyse zur Expression von CK2 α / α' in McA-RH7777 nach Transfektion

Nach Herstellung der Gesamtzellextrakte wurden jeweils 50 μ g Kontroll siRNA (Proben Nr.1) und CK2 α / α' siRNA (Proben Nr.2) auf ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Blot auf eine PVDF-Membran wurde mithilfe des monoklonalen Mausantikörpers 1A5 CK2 α detektiert. Mit dem polyklonalen Kaninchenserum #30 wurde die Prozedur zum Nachweis von CK2 α' wiederholt.

Ob die Transfektion der Zellen mit RNA gegen CK2 α und CK2 α' tatsächlich in einer verringerten CK2-Aktivität resultiert, wurde durch einen *in vitro*-CK2-Kinaseassay (siehe 4.3.5) bestimmt.

30 μ g des Gesamtzellextrakts wurden in 20 μ l CK2-Kinasepuffer aufgenommen und anschließend mit 30 μ l CK2-Mix versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37°C und weiteren 5 min auf Eis wurden 30 μ l der Probe auf das Ionenauschfilterpapier pipettiert. Durch mehrere Waschschrte wurde nicht gebundenes Substrat entfernt und das Filterpapier unter Rotlicht getrocknet. Die Čerenkov-Strahlung wurde mittels Szintillationszähler gemessen.

Aus den als Doppelwerten ermittelten Werten lässt sich für die mit siRNA transfizierten Zellen eine Herunterregulation auf etwa 40% der Kontroll-siRNA ablesen.

Die Hemmung der CK2 α / α' durch Transfektion der McA-RH7777 mit siRNA führt somit zu einer deutlichen Abnahme der Kinaseaktivität der CK2.

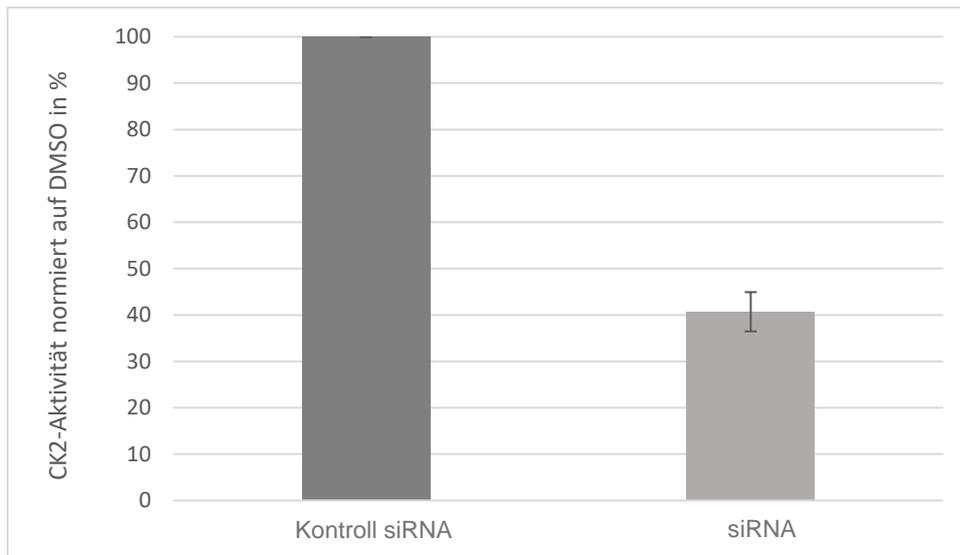


Abbildung 25 8 In vitro CK2-Kinaseaktivitätsmessung zur Analyse der CK2-Aktivität in McA-RH7777 nach Transfektion mit siRNA

McA-RH7777-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion von CK2-siRNA geerntet und zu Gesamtzellextrakten verarbeitet. Je 30 µg Gesamtprotein der Kontroll-siRNA und der siRNA wurden bezüglich der CK2-Aktivität der Proben als Doppelansatz in einem CK2-Kinaseassay bestimmt. Die Werte der siRNA-Proben werden dabei auf die Ergebnisse der Kontroll-siRNA (100%) normiert.

Mit der oben gezeigten Hemmung der CK2-Kinaseaktivität und den herunterregulierten CK2 α/α' -Untereinheiten stellte sich die Frage, ob sich die Transfektion der McA-RH7777 in einer Veränderung auf Proteinebene der FBP1 widerspiegeln würde.

Je 50 µg Gesamtzellextrakte der Proben wurden auf ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kontrolle wurden 30 µg Gesamtprotein aus MCF-7-Zellen mitgeführt. Mittels monoklonalem Kaninchenantikörper D2T7F wurde anschließend FBP1 detektiert.

Der Nachweis von FBP1 in transfizierten McA-RH7777 Zellen gelang jedoch auch im Folgenden nicht.

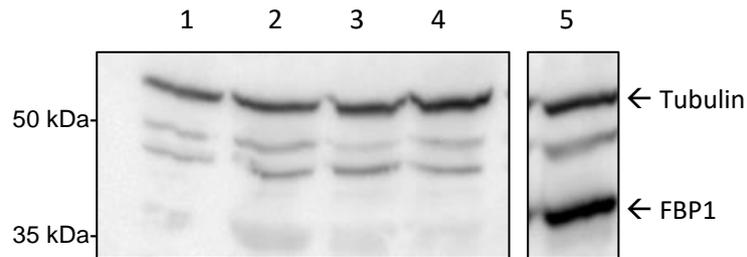


Abbildung 26 Western Blot Analyse zur Expression von FBP1 in McA-RH7777 nach Transfektion mit CK2 siRNA

Je 50 µg Gesamtzellextrakt transfizierter McA-RH7777-Zellen und 15 µg MCF-7 (Proben Nr.5) wurden auf ein 12.5% SDS-Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Nummerierung 1-4 gibt dabei Aufschluss über die verwendete siRNA. Transfiziert wurden die McA-RH7777 Zellen dabei mit Kontroll-siRNA (Nr.1), und jeweils einem Pool aus CK2α/α'-siRNA Maus (Nr.2), Ratte (Nr.3) und human (Nr.4). Der Blot auf eine PVDF-Membran erfolgte über Nacht. Zur Detektion wurden die entsprechenden Antikörper α-Tubulin und FBP1 verwendet.

Da der Nachweis der Proteinexpression von FBP1 im Zellmodell mittels Western Blot-Analyse nicht gelang, sollte in den folgenden Experimenten die enzymatische Aktivität des Gluconeogenese-Enzyms Fructose-1,6-bisphosphatase indirekt anhand der Glucose-neubildung detektiert werden.

5.12 Nachweis von Gluconeogenese anhand von Glucoseneubildung

Eine Möglichkeit des Nachweises der Gluconeogenese ist die direkte Messung der Glucosekonzentration mittels Biolumineszenz Assay. Hierbei wird die in biologischen Proben vorhandene und produzierte Menge an Glucose mithilfe der Glucose-Dehydrogenase zu Glucono-1,5-lacton umgewandelt. Dieser Schritt beinhaltet die Umwandlung von NAD⁺ zu NADH. In Gegenwart von NADH wird Pro-Luciferin durch die Reduktase zu Luciferin umgewandelt. Luciferin wird mittels Luciferase und ATP zur Erzeugung einer Lumineszenz genutzt, wobei die erzeugten relativen Lichteinheiten (RLU) proportional zur Menge an Glucose der Proben sind.

Hierfür wurde das Glucose-Glo™ Assay von Promega verwendet. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde das Assay zur Messung von Zellen in Kultur und somit die kombinierte intra- und extrazelluläre, sowie die extrazelluläre Konzentration an Glucose bestimmt.

Dazu wurden McA-RH7777-Zellen mit einer Zellzahl von 15,000 Zellen/Well auf einer 96 Well-Platte ausgesät. McA-RH7777-Zellen wurden 24 Stunden mit DMEM mit 1 g/L Glucose inkubiert. Danach folgten zwei Waschschrte mit Krebs-Ringer-Puffer zur Entfernung von restlicher Glucose. Darauffolgend wurden die Zellen 1.5 h mit KRP inkubiert, was dem Aufbrauchen der intrazellulären Glucosevorräte diente.

Anschließend wurden die Zellen für mehrere Stunden in 50 µl modifiziertem KRP inkubiert. Diesem wurde neben 10 mM Lactat als Gluconeogenesesubstrat noch 2 µM Forskolin als stimulierendes Agens der Adenylatcyclase-Aktivität hinzugefügt, um die Gluconeogenese der Zellen zu stimulieren. Nach der gewünschten Zeit wurde die Hälfte des Mediums entnommen und für etwaige spätere Bestimmung der sezernierten Glucose konserviert. Zu der verbleibenden Menge Medium in den Wells wurden 12.5 µl der Inaktivierungslösung gemäß Hersteller zugefügt und die Platte 5 min auf einem Schüttler platziert. Dieselbe Menge Neutralisationslösung wurde im Anschluss beigemischt. Nach Zugabe von 50 µl Glucose-Nachweisreagenz erfolgte deren einstündige enzymatische Reaktion unter Abdunkelung. Die Lumineszenz des Produktes wurde im Anschluss mittels Tecan Reader bestimmt.

Die gemessenen RLU von mit 10 µM CX-4945, bzw. DMSO behandelten McA-RH7777 Zellen nach 1 und 3 Stunden sind in Abbildung 27 dargestellt.

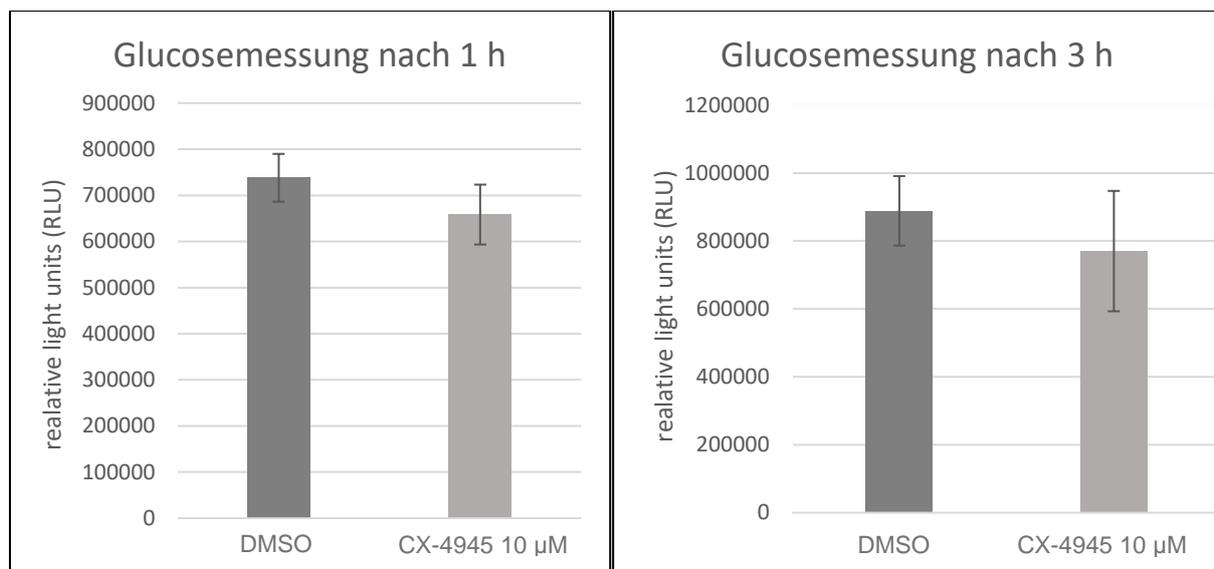


Abbildung 27 Glucosemessungen in McA-RH7777 nach Behandlung mit 10 µM CX-4945/DMSO für 24h

McA-RH7777-Zellen wurden 24 Stunden mit 10 µM CX-4945/ DMSO bei DMEM 1 g/L Glucose behandelt. Anschließend folgten 1.5 Stunden Inkubation mit Krebs-Ringer-Puffer. Für den Testzeitraum von 1 bzw. 3 Stunden wurde der KRP mit zusätzlich 10 mM Lactat 2 µM Forskolin eingesetzt. Abschließend wurde die Gesamtglucose (intra- und extrazellulär) mithilfe des Glucose-Glo™ Assay bestimmt und graphisch dargestellt. Dabei wurden der Mittelwert aus drei technischen Replikaten gebildet und die Ergebnisse der Messungen für DMSO und CX-4945 in der vom Kit gemessenen Einheit RLU aufgetragen.

Die mit CX-4945 behandelten Zellen zeigten gegenüber den Kontrollzellen eine Reduktion um etwa 10% nach einer Stunde und ca. 14% nach drei Stunden. Aufgrund der großen Standardabweichung waren diese Werte nicht signifikant, zeigten jedoch tendenziell eine Verringerung der Glucosekonzentration.

Zur Vereinfachung der Messungen wurde in den folgenden Experimenten ausschließlich die von den Zellen sezernierte Glucose (extrazelluläre Glucose) gemessen. Dazu wurde als Probenmaterial ausschließlich Zellmedium herangezogen. Da der Effekt nach 3 Stunden nicht wesentlich höher ausfiel, beschränkte sich dieser Versuch auf die Messung der Glucose nach einer Behandlungsdauer von 1 Stunde.

Das untenstehende Diagramm zeigt die gemessenen RLU-Werte der CX-4945- bzw. der DMSO-Proben. Hierbei ist eine Reduktion der CX-4945-Proben zu erkennen. Der reduzierte RLU-Wert spricht dabei für eine verminderte extrazelluläre Konzentration der Glucose.

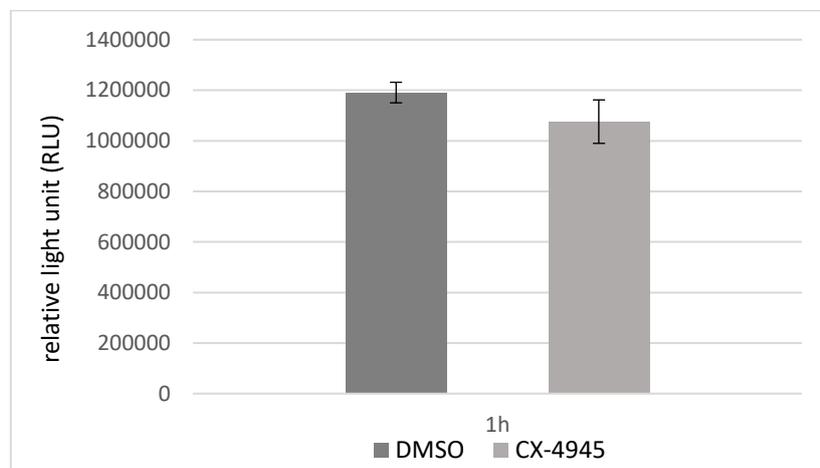


Abbildung 28 Extrazelluläre Glucosebestimmung in McA-RH7777 nach Behandlung mit CX-4945/DMSO für 24 h

McA-RH7777-Zellen wurden 24 Stunden mit 10 μ M CX-4945/ DMSO bei DMEM 1 g/L Glucose behandelt. Anschließend folgten 1.5 Stunden Inkubation mit Krebs-Ringer-Puffer. Für den Testzeitraum von 1 bzw. 3 Stunden wurde ein modifizierter KRP zusätzlichen 10 mM Lactat 2 μ M Forskolin eingesetzt. Zur Messung der Glucose mittels des Glucose-Glo™ Assay wurden 25 μ l des Mediums verwendet und bestimmt. Die CX-Werte wurden jeweils mit den Messergebnissen der DMSO-Gruppe verglichen. Die Testung erfolgte als Triplet drei technischer Replikate

In einem folgenden Experiment wurden zur Messung der extrazellulären Glucose Proben der mit CK2 α / α' -siRNA behandelten McA-RH7777-Zellen untersucht.

Gemäß den Vorgaben des Herstellers wurden die Proben 100-fach verdünnt und 50 μ l 1:1 mit der Glucose-Nachweisreagenz vermischt und für 60 s vorsichtig geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min unter abgedunkelten Bedingungen folgte die Messung der Lumineszenz.

Das folgende Diagramm zeigt dabei die ermittelten RLU-Werte der CK2 α/α' -siRNA, sowie der Kontroll-siRNA. Dabei ist eine deutliche Reduktion der extrazellulären Glucose in den CK2 α/α' -siRNA Proben erkennbar.

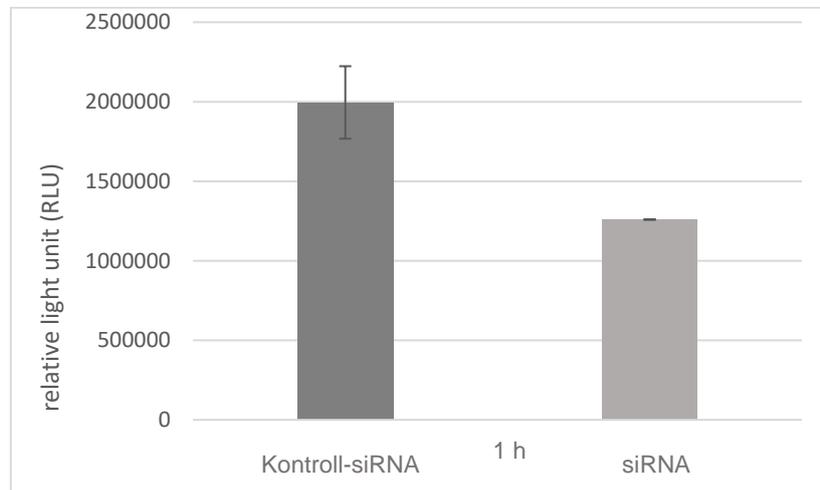


Abbildung 29 Messung der extrazellulären Glucose von McA-RH7777 nach Transfektion mit siRNA CK2 α/α'

McA-RH7777-Zellen wurden einen Tag vor der Testung mit siRNA transfiziert. Die Kontroll-siRNA stellt dabei die Referenz dar, während CK2 α/α' siRNA zu einem „Knock-down“ der CK2 in den Zellen führt. In den Überständen dieser Zellen wurde die extrazelluläre Glucose gemessen und die Ergebnisse in obenstehendem Diagramm aufgetragen. Dabei handelt es sich jeweils um den Mittelwert zweier biologischer Replikate.

Die Messung der extrazellulären Glucose in transfizierten McA-RH777-Zellen ergab auf die Probe mit Kontroll-siRNA normiert einen Wert von 63.1% und somit eine Verringerung der sezernierten Glucose um mehr als ein Drittel. Die Hemmung der CK2-Kinaseaktivität scheint die gluconeogenetische Aktivität der McA-RH777-Zellen zu reduzieren.

6 Diskussion

Der Erhalt der Glucosehomöostase wird zu einem großen Teil durch Insulin und Glucagon gewährleistet [11]. Dabei agieren das in den pankreatischen β -Zellen synthetisierte Insulin und das aus den α -Zellen sezernierte Glucagon als Gegenspieler [85,98].

Das als Präproinsulin synthetisierte und schlussendlich in Insulin umgewandelte Endprodukt der Proteinbiosynthese wird in Sekretgranula gelagert auf einen exogenen Glucosereiz hin sezerniert [37,85]. Noch vor Erreichen des Glucose-Schwellwerts für die Insulinfreisetzung wird durch die Aufnahme der Glucose in die Langerhans-Zellen die Insulinbiosynthese initiiert [15]. Die über den Glucosetransporter GLUT1 aufgenommene Glucose wird durch die Glucokinase (GK) phosphoryliert und der Energiegewinnung mittels Glykolyse zugeführt [98]. In der Zelle steigt die Konzentration von ATP, was zum Schließen von ATP-sensitiven K^+ -Kanälen führt. Es folgt die Depolarisation und bedingt durch den Calciumeinstrom kommt es zur Sekretion von Insulin [52,85].

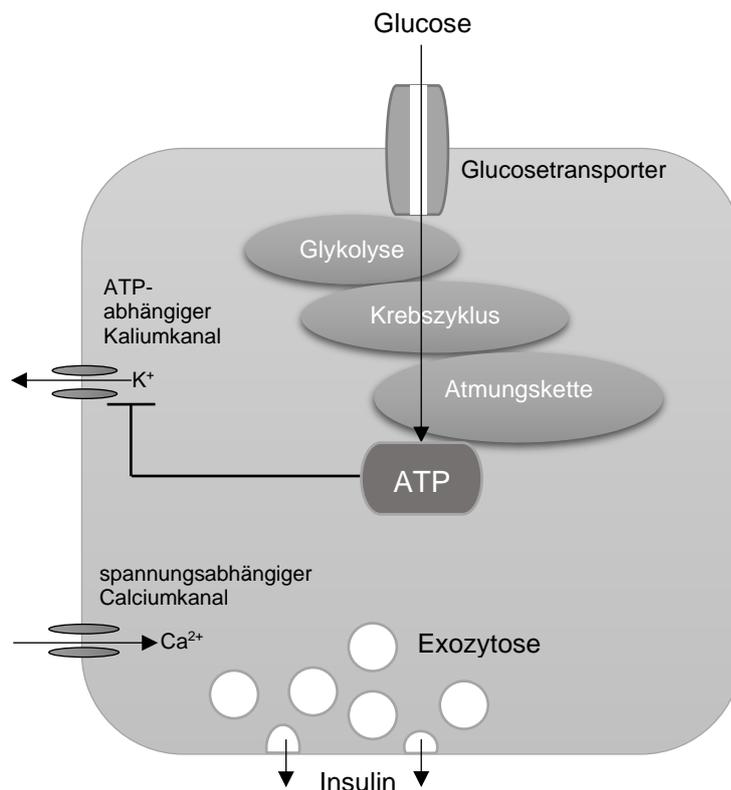


Abbildung 30 Vereinfachte schematische Darstellung der glucosestimulierten Insulinsekretion in β -Zellen

In der pankreatischen β -Zelle wird die aufgenommene Glucose zur ATP-Synthese verwendet. Die Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration hemmt den Kaliumausstrom aus der Zelle. Aufgrund des Calciumeinstroms kommt es zur Depolarisation der Zellmembran. Diese führt zur Exozytose des in Granula gespeicherten Insulins.

Diese Signalkaskade unterliegt strengen Kontrollen und wird durch eine Vielzahl von Enzymen gesteuert [2]. Eine wichtige Rolle wird dabei der CK2 zuteil, welche regulatorisch auf Pdx1 und damit auf einen Haupttranskriptionsfaktor des Insulins wirkt [74]. Obwohl hunderte Substrate der CK2 beschrieben sind, ist das Wissen über deren Zielmoleküle in den Langerhans-Zellen noch begrenzt [17,74]. Die Beteiligung an Stoffwechselfunktionen stellt dabei nur eine Funktion der CK2 dar. Vielmehr dominiert ihre wichtige Rolle an Zellproliferation und Genexpression, aber auch an Entzündungsreaktionen und Apoptose [17,38,62].

Dieses breite Spektrum bietet das Potential, dass die CK2 noch an weiteren regulatorischen Prozessen in pankreatischen β -Zellen beteiligt sein könnte. So könnte ein tiefergreifendes Verständnis der CK2-abhängigen Prozesse, auch im Hinblick verschiedener pankreatischer Pathologien, von Interesse sein. Weitere Erkenntnisse und das Wissen über Pathomechanismen könnten neue Therapieansätze eröffnen.

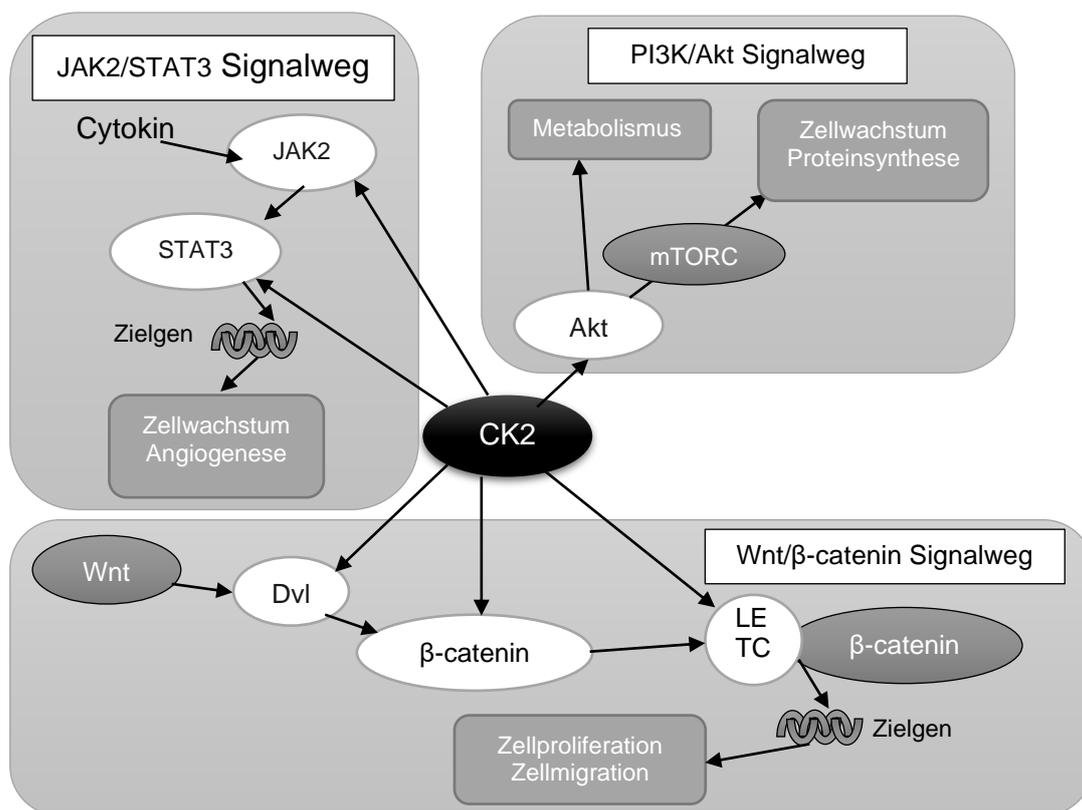


Abbildung 31 Schematische Darstellung ausgewählter CK2-abhängiger Signalwege

Bei den dargestellten Signalwegen handelt es sich nur um eine Auswahl relevanter zellulärer Signalwege, die eine Abhängigkeit der CK2 aufweisen. Hierbei dominieren zelluläre Funktionen wie Zellproliferation, Zellüberleben und Angiogenese.

Zwei Gene zeigten im Rahmen eines in der Arbeitsgruppe durchgeführten Diabetes-assoziierten qRT-PCR-Array eine Herunterregulation ihrer Genexpression nach Hemmung der

CK2-Aktivität. Die Fructose-1,6-Bisphosphatase 1 (FBP1), als Schlüsselenzym der Gluconeogenese, und die Ektonukleotidpyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 (ENPP1), wiesen je eine um den Faktor 3 reduzierte Genexpression auf [100]. Im Rahmen dieser Dissertation sollte eine CK2-Abhängigkeit von FBP1 und ENPP1 auf Ebene der Gen- und Proteinexpression untersucht werden. Mit eigens entworfenen Primern sollten die Genexpressionsprofile in qRT-PCR-Analysen untersucht werden. Die Erkenntnisse galt es im Anschluss auf Proteinebene mittels Western Blot-Analysen zu verifizieren.

Die Bildung von Pyrophosphat durch die ENPP1 hemmt die Knorpel- und Knochenmineralisation [84,93]. Auch mit der Entstehung von Diabetes mellitus ist das Transmembran-Glykoprotein assoziiert, da es bei Überexpression von humaner ENPP1 in Mäusen zu erhöhten Insulin- und Glucosespiegeln kommt [29,34]. Dieser Effekt lässt sich auf eine Hemmung der Insulinrezeptorfunktion durch ENPP1 zurückführen [71]. Die sich daraus entwickelnde Resistenz gegen die physiologische Wirkung des Insulins spielt eine Rolle in der Pathogenese des T2DM [107]. Da es bisher keine Anhaltspunkte einer Insulinrezeptorhemmung durch ENPP1 im Rahmen eines physiologischen Regelkreises gibt, muss der Effekt einer Herunterregulation von ENPP1 im Hinblick der Pathogenese des T2DM weiter untersucht werden.

Die FBP1, in ihrer zentralen Rolle als geschwindigkeits-bestimmendes Enzym der Gluconeogenese, ermöglicht verschiedenen Geweben die Neubildung von Glucose [73,97]. Als Angriffspunkt einer T2DM-Therapie gehandelt, bewirkt eine Hemmung der FBP1 bei diabetischen Ratten eine dosisabhängige Abnahme der Plasmaglukosekonzentration [32].

Die verwendete INS-1 832/13-Zelllinie ist als nützliches Zellkulturmodellsystem der pankreatischen glucosestimulierten Insulinfreisetzung angesehen [36]. Einen Vorteil stellt dabei der morphologische Ursprung der Zellen dar, sodass im Modell lediglich mit β -Zell-spezifischen Funktionen zu rechnen sein sollte. Aufgrund der fortlaufenden Kultivierung der Zellen kann ein progredienter Verlust der spezifischen Funktion jedoch nicht ausgeschlossen werden. So zeigten die Untersuchungen in der Arbeitsgruppe eine Proteinexpression von Glucagon in der Zelllinie [100]. Unter Verwendung von INS-1 832/13-Zellen konnte Michelle Völcker in einem von ihr durchgeführten Diabetes-assoziierten qRT-PCR-Array für die Gene ENPP1 und FBP1 eine Herunterregulation der Genexpression nachweisen. Diese lag, im Vergleich mit der Kontrolle, jeweils um den Faktor 3 reduziert vor [100]. Auf Grundlage der Ergebnisse im Array erfolgte die weiterführende Untersuchung von ENPP1 und FBP1. Zur Durchführung von qRT-PCR-Experimenten wurden eigens Primer entworfen. Hierbei konnte im Rahmen dieser Arbeit für beide Gene, nach Hemmung der CK2-Aktivität mittels dem Hemmstoff CX-4945, jeweils eine um etwa den Faktor 2 reduzierte Genexpression ermittelt werden. Diese Ergebnisse weisen in die gleiche Richtung, wie schon zuvor die Ergebnisse

von M. Völcker. Jedoch verdeutlicht der misslungene Nachweis der beiden Proteine in den β -Zellen die Notwendigkeit einer organübergreifenden Betrachtung der Vorgänge. Es ist dabei nicht anzunehmen, dass aufgrund des verwendeten Antikörpers D2T7F der Nachweis des Proteins scheiterte. Das als Kontrolle mitgeführte Lebergewebe zeigte bei der Testung verlässlich Banden bei etwa 39 kDa und damit der Größe von FBP1. In den INS-1 832/13-Zellen lag ausreichend mRNA zur Durchführung der qRT-PCR vor. Ursächlich für den ausbleibenden Nachweis des Proteins könnte eine zu geringe Translation der mRNA sein. Für gesundes Pankreasgewebe ist dies durchaus schlüssig, da die Bauchspeicheldrüse nicht wie Leber und Niere typisch gluconeogenetisches Gewebe ist [23]. Jedoch ist dieser Punkt strittig, da Yáñez 2005 die Expression von FBP in Inselzellen von Mensch und Ratte nachwies [105]. Zwar scheint FBP1 in β -Zellen schwach nachweisbar zu sein, soll dabei aber nicht im Rahmen der Gluconeogenese vorliegen. Veränderte Expressionslevel von FBP1 regulieren die glucosestimulierte Insulinsekretion der β -Zellen [55,111]. In der Literatur beziehen sich entsprechende Stellen zur Expression von FBP1 jedoch meist nur auf den mRNA-Gehalt [58,59].

Aufgrund der Fähigkeit zur Gluconeogenese, deren unabdingbare Voraussetzung das Vorhandensein von FBP1 ist, wurden weitere Experimente mit der Rattenhepatom-Zelllinie McA-RH7777 durchgeführt. Das Vorkommen von ENPP1 in Hepatozyten begründete diesen Schritt ebenfalls [90]. Als Hemmstoff der CK2 sollte aufgrund einer effizienten Hemmung in den INS-1 832/13 weiterhin CX-4945 verwendet werden.

Auch in den McA-RH7777-Zellen besteht weiterhin die Problematik einer nicht monoselektiven Hemmung von CX-4945. Bei der Bestimmung des Einflusses von CX-4945 auf 235 Kinasen, was annähernd 50% des Kinoms entspricht, war nur bei 49 Kinasen ein Effekt zu verzeichnen [12]. Damit ist die Selektivität von CX-4945 als hoch zu bezeichnen. Neuere Derivate, abgeleitet von CX-4945 als deren Leitverbindung, weisen dabei eine höhere Hemmaktivität bei gleichzeitig verbesserter Selektivität auf [102]. Der erst kürzlich entwickelte CK2-Inhibitor SGC-CK2-1 zeigt dabei eine deutlich höhere Selektivität als bisherige CK2-Hemmstoffe [104]. Die verwendete Konzentration von 10 μ M CX-4945 wies Abbildung 16 entsprechend auch in den Hepatomzellen eine effektive Hemmung auf und reduzierte die Aktivität der CK2 nach einer 24-stündigen Behandlung auf etwa ein Drittel. Die Verringerung der Restaktivität mit höheren eingesetzten Konzentrationen des Hemmstoffes birgt das Risiko, sich zytotoxisch auf die Zellen auszuwirken. So wurden höhere Konzentrationen CX-4945 mit einer Antitumorwirkung beim Cholangiokarzinom in Verbindung gebracht und stellen damit in Kombination mit weiteren Zytostatika eine mögliche Therapieform des Karzinom dar [108]. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass der neue CK2-Inhibitor SBC-CK1 trotz seiner herausragenden Selektivität nur wenig wirksam die Zellproliferation verschiedener

Tumorarten hemmt, was die antiproliferative Wirkung von CX-4945 eher auf unspezifischen Nebenwirkungen vermuten lässt [65]. Nicht nur die Toxizität eines etwaigen Hemmstoffes limitiert dessen Einsatz zur Aktivitätsreduktion. Bei einem kompletten Ausschalten der CK2-Untereinheiten α und β kommt es im Mausmodell zur embryonalen Letalität [20]. In Anbetracht dieser Bedingungen stellte sich die eingesetzte Konzentration von 10 μ M CX-4945 als optimaler Kompromiss zwischen effektiver Hemmung und der Vermeidung zytotoxischer Effekte heraus.

Eine Bestimmung der mRNA-Expression von ENPP1 und FBP1 nach CK2-Hemmung zeigte in den McA-RH7777, wie schon zuvor in den INS-1 832/13, eine Herunterregulation der beiden Gene. Lediglich für ENPP1 gelang die densitometrische Quantifizierung des Proteins mit einer um das 0.67-fache Herunterregulation der Proteinmenge nach Hemmung der CK2. Eine erweiterte Untersuchung des Einflusses der CK2-Hemmung auf ENPP1 war im Rahmen meiner Arbeit nicht zu realisieren, sodass der weitere Fokus auf dem Nachweis von FBP1 lag. Es gelang jedoch nicht, einen adäquaten Proteinnachweis für FBP1 in McA-RH7777 zu generieren. Auch durch die Reduktion der zugeführten Glucosemenge im Kulturmedium und gluconeogenetischer Stimulation blieb die Nachweisbarkeit aus. Die geschaffenen „Hungerbedingungen“ sollten mit Forskolin als Aktivator der Adenylatcyclase und Lactat als Substrat zu einer erhöhten Gluconeogenese führen [60,110]. Die dabei zur Aktivierung der Adenylatcyclase verwendeten Konzentrationen von 2-20 μ M Forskolin könnten deutlich zu gering sein. Leiser und Blum beobachteten erst ab ungefähr 100 μ M Forskolin einen dem Glucagon vergleichbaren Effekt [60]. Als Antikörperkontrolle wurde ab diesem Zeitpunkt nicht mehr Lebergewebe eingesetzt. Zur besseren Steuerbarkeit und Reduktion der einzusetzenden Menge kam, wie schon im Datenblatt des FBP1-Antikörpers D2T7F beschrieben, MCF-7-Gesamtzellextrakt zur Anwendung. Die Brustkrebs-Zelllinie weist eine deutlich erhöhte Menge an FBP1 auf und eignet sich daher als Positivkontrolle [31]. Wie bereits zuvor in den INS-1 832/13 konnte die verminderte Genexpression nicht auf Proteinebene dargestellt werden. Zum Ausschluss von unspezifischen Nebeneffekten als Ursache für den ausbleibenden Proteinnachweis sollte die Inhibition der CK2 in Ergänzung zur pharmakologisch vermittelten Wirkung des Hemmstoffes CX-4945 mit *small interfering RNA* (siRNA) erfolgen. Der entscheidende Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die Herunterregulation eines spezifischen Gens vollzogen werden kann, ohne die unspezifischen Nebeneffekte eines klassischen Hemmstoffes [30,94]. Die dabei verwendete siRNA sollte zu einer Herunterregulation der CK2-Untereinheiten α und α' führen. Die selektive Herunterregulation einzelner Untereinheiten der CK2 trifft somit jedoch auch zelluläre Prozesse, die nur durch die Bindung der Untereinheit zu einem zusätzlichen Effekt führt, welcher nicht mit der Kinaseaktivität des Holoenzym korreliert [109]. In einer Western Blot-Analyse konnte die verringerte Expression der Untereinheiten nach Transfektion mit der entsprechenden siRNA detektiert werden. Zur Überprüfung der CK2-

Aktivität wurde ein in-vitro CK2-Kinaseaktivitätsassay verwendet, welcher nach einmaliger Transfektion der Zellen eine auf ca. 40% des Ausgangswertes verringerte Aktivität aufwies. Trotz der erfolgreichen Hemmung der CK2 mittels siRNA-Transfektion gelang der Proteinnachweis für FBP1 in McA-RH7777-Zellen jedoch weiterhin nicht. Basierend auf den oben diskutierten Ergebnissen wäre der falsch gewählte Zeitpunkt des Proteinnachweises denkbar. Behandelte oder transfizierte Zellen wurden jeweils nach 24h geerntet, um einer abfallenden Hemmwirkung bzw. einer zunehmenden Zytotoxizität vorzubeugen. In verschiedenen Krebszellen kommt es zur Veränderung des Stoffwechsels, wie einer erhöhten Glucoseaufnahme und, trotz ausreichender Sauerstoffzufuhr, deren Verstoffwechslung hin zu Lactat [64]. Dieser Schritt scheint entscheidend die metabolischen Anforderungen hin zur gesteigerten Tumorzellproliferation zu gewährleisten [47]. So trägt beim Hepatozellulären Karzinom (HCC) eine glucometabolische Reprogrammierung zur schlechten Prognose bei [95]. Dieser Prozess lässt sich vor allem in Tumoren beobachten, deren Ursprung in gluconeogenen Geweben wie Leber und Niere liegt [63]. Die Dysregulierung des oxidativen Stoffwechsels hin zur abnorm gesteigerten aeroben Glykolyse ist als Teil des Warburg-Effektes beschrieben, jedoch sind Ursache und Funktion dieser Anpassung nicht vollends geklärt [64,80]. Dabei führt eine gehemmte Gluconeogenese zur weiteren Steigerung der Glykolyse. Eine Schlüsselrolle bei dieser Hemmung könnte der Transkriptionsregulator enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) einnehmen. Erst kürzlich wurde dessen unterdrückende Wirkung auf die Expression von FBP1 beschrieben [63]. Andererseits zeigten sich in Proben von HCC-Patienten eine zur Energieversorgung des Tumors beitragende gesteigerte Gluconeogenese, welche dem erhöhtem Konsum entgegenwirken soll [50]. Auch die Rolle einer mitochondrialen Dysfunktion bei der Entstehung des Warburg-Effekts wird diskutiert [5]. In McA-RH7777 ist eine solche Dysfunktion bisher nicht bekannt. Eine andere Morris-Hepatom-Zelllinie, das Morris-Hepatom 3924A, weist jedoch bei einer geringen Anzahl funktionierender Mitochondrien einen ausgeprägten Warburg-Effekt auf [88].

Aufgrund der Schwierigkeit, FBP1 als Protein nachzuweisen, wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit versucht, die Funktionalität des FBP1-Proteins zu belegen. Eine Option stellt dabei die auf einem Biolumineszenz-Assay basierende Messung von Glucose dar. Das bei der Oxidation von Glucose gebildete NADH reduziert mit einer Reduktase Pro-Luciferin zu Luciferin. Unter Aufwendung von ATP erzeugt eine Luciferase im anschließenden Schritt eine Biolumineszenz. Die dabei entstehende Menge Licht, gemessen als relative Lichteinheit, ist proportional zur Menge an Glucose in der Probe. Die erste Messung erfolgte hierbei nach Hemmung der CK2-Aktivität durch 10 μ M CX-4945 bzw. DMSO. Im ersten Experiment wurden die Glucosespiegel nach 1 und 3 Stunden bestimmt, da mit der Maximalwirkung des Forskolin nach etwa 30 min zu rechnen ist [21]. Der Abbildung 27 entnommen steigen die Glucosewerte im Verlauf an. Die Standardabweichung verdeutlicht die Notwendigkeit einer höheren Anzahl

an Proben. Ob es sich bei dem zu erahnenden Effekt wirklich um erniedrigte intrazelluläre Glucoselevel handelt, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Die Architektur des Assay bietet auch die Möglichkeit einer ausschließlich extrazellulären Glucosemessung. Die Zellen wurden dafür 24 Stunden in Kulturmedium mit 5.5 mM Glucose hypoglykämisch kultiviert. In den folgenden 90 Minuten wurde durch die Inkubation mit Krebs-Ringer-Puffer (KRP) eine weitere externe Glucosezufuhr unterlassen. Entsprechend der Versuchsdauer von 1 bzw. 3 Stunden wurden die Zellen mit modifiziertem KRP inkubiert. Hierbei handelt es sich um regulären KRP, welcher zur Stimulation der Gluconeogenese mit 10 mM Lactat und 2 μ M Forskolin versetzt wurde. Wie in Abbildung 27 gezeigt, scheint sich die Diskrepanz der Glucosewerte zwischen Probe und Kontrolle über die Versuchszeit zu verringern. Auch hier lässt sich aufgrund der Standardabweichung die These einer Glucosereduktion nach Behandlung mit 10 μ M CX-4945 nicht zweifelsfrei bestätigen. In einem weiteren Versuch wurde die sezernierte Glucose in zuvor mit CK2 α/α' -siRNA transfizierten Zellen bestimmt. Dabei ergab die Messung der vor Zellernte konservierten Überstände einen auf 63.1% reduzierten Glucosewert der siRNA-Probe, verglichen mit der Kontrolle.

Zusammenfassend deuten die bisherigen Befunde zwar auf eine CK2-abhängige Regulation der Fructose-1,6-Bisphosphatase 1 hin. Dennoch gebieten die erhobenen Daten, eine CK2-vermittelte Hemmung der Gluconeogenese weitergehend zu untersuchen. Ruft man sich die Substratvielfalt der CK2 vor Augen darf nicht vergessen werden, dass es sich hierbei um eine äußerst pleiotrope Kinase handelt. Somit ist der genaue Pfad dieser Regulation noch keineswegs beleuchtet. Erst mit einer deutlichen Erhöhung der Probenzahl wird sich eine Aussage zur Signifikanz der erhobenen Werte bestimmen lassen. Auch kann aus den vorliegenden zellkulturellen Ergebnissen die biologische Bedeutung der Interaktion nicht zweifelsfrei bestimmt werden. Hierfür müssten die Ergebnisse im lebenden Organismus verifiziert werden. Weitere Erkenntnisse zur Regulation von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels durch CK2 könnten sich zukünftig nicht nur als mögliche Therapiegrundlage bei Tumoren eignen. Auch könnten neue Medikamentenklassen zur antidiabetischen Therapie durch Hemmung der CK2 das Repertoire der Antidiabetika erweitern.

7 Literaturverzeichnis

1. Ahmed K, Gerber DA, Cochet C (2002) Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol* 12:226–230
2. Al Quobaili F, Montenarh M (2012) CK2 and the regulation of the carbohydrate metabolism. *Metabolism* 61:1512–1517
3. American Diabetes Association (2013) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 36:S67–S74
4. Ampofo E, Nalbach L, Menger MD, Montenarh M, Götz C (2019) Protein Kinase CK2-A Putative Target for the Therapy of Diabetes Mellitus? *Int J Mol Sci* 20:
5. Amuthan G, Biswas G, Zhang S-Y, Klein-Szanto A, Vijayasarathy C, Avadhani NG (2001) Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J* 20:1910–1920
6. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 5:209–219
7. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB (1992) Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130:167–178
8. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW (2014) Type 1 diabetes. *Lancet* 383:69–82
9. Aumüller G, Aust G, Conrad A E (2020) *Duale Reihe Anatomie*. Hrsg. 5., korrigierte Auflage edition. Thieme, Stuttgart
10. Bakay M, Pandey R, Hakonarson H (2013) Genes involved in type 1 diabetes: an update. *Genes (Basel)* 4:499–521
11. Bansal P, Wang Q (2008) Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E751-761
12. Battistutta R, Cozza G, Pierre F, Papinutto E, Lolli G, Sarno S, O'Brien SE, Siddiqui-Jain A, Haddach M, Anderes K, Ryckman DM, Meggio F, Pinna LA (2011) Unprecedented selectivity and structural determinants of a new class of protein kinase CK2 inhibitors in clinical trials for the treatment of cancer. *Biochemistry* 50:8478–8488
13. Bello V, Goding JW, Greengrass V, Sali A, Dubljevic V, Lenoir C, Trugnan G, Maurice M (2001) Characterization of a Di-leucine-based Signal in the Cytoplasmic Tail of the Nucleotide-pyrophosphatase NPP1 That Mediates Basolateral Targeting but not Endocytosis. *Mol Biol Cell* 12:3004–3015
14. Besic V, Stubbs RS, Hayes MT (2014) Liver ENPP1 protein increases with remission of type 2 diabetes after gastric bypass surgery. *BMC Gastroenterol* 14:222
15. Boland BB, Rhodes CJ, Grimsby JS (2017) The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. *Mol Metab* 6:958–973
16. Boldyreff B, Meggio F, Pinna LA, Issinger OG (1994) Protein kinase CK2 structure-function relationship: effects of the beta subunit on reconstitution and activity. *Cell Mol Biol Res* 40:391–399

17. Borgo C, Ruzzene M (2019) Role of protein kinase CK2 in antitumor drug resistance. *J Exp Clin Cancer Res* 38:
18. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR (2014) Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:
19. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
20. Buchou T, Vernet M, Blond O, Jensen HH, Pointu H, Olsen BB, Cochet C, Issinger O-G, Boldyreff B (2003) Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 23:908–915
21. Burns TW, Langley PE, Terry BE, Bylund DB, Forte LR (1987) Comparative effects of forskolin and isoproterenol on the cyclic AMP content of human adipocytes. *Life Sci* 40:145–154
22. Chellappan DK, Sivam NS, Teoh KX, Leong WP, Fui TZ, Chooi K, Khoo N, Yi FJ, Chellian J, Cheng LL, Dahiya R, Gupta G, Singhvi G, Nammi S, Hansbro PM, Dua K (2018) Gene therapy and type 1 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother* 108:1188–1200
23. Chung ST, Chacko SK, Sunehag AL, Haymond MW (2015) Measurements of Gluconeogenesis and Glycogenolysis: A Methodological Review. *Diabetes* 64:3996–4010
24. Costa Leite T, Da Silva D, Guimarães Coelho R, Zancan P, Sola-Penna M (2007) Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochem J* 408:123–130
25. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA (2018) Type 1 diabetes. *Lancet* 391:2449–2462
26. Dominguez I, Mizuno J, Wu H, Song DH, Symes K, Seldin DC (2004) Protein kinase CK2 is required for dorsal axis formation in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* 274:110–124
27. Dominguez I, Sonenshein GE, Seldin DC (2009) Protein kinase CK2 in health and disease: CK2 and its role in Wnt and NF-kappaB signaling: linking development and cancer. *Cell Mol Life Sci* 66:1850–1857
28. Dong C, Yuan T, Wu Y, Wang Y, Fan TWM, Miriyala S, Lin Y, Yao J, Shi J, Kang T, Lorkiewicz P, St Clair D, Hung M-C, Evers BM, Zhou BP (2013) Loss of FBP1 by Snail-mediated Repression Provides Metabolic Advantages in Basal-like Breast Cancer. *Cancer Cell* 23:316–331
29. Dong H, Maddux BA, Altomonte J, Meseck M, Accili D, Terkeltaub R, Johnson K, Youngren JF, Goldfine ID (2005) Increased hepatic levels of the insulin receptor inhibitor, PC-1/NPP1, induce insulin resistance and glucose intolerance. *Diabetes* 54:367–372
30. Dong Y, Siegwart DJ, Anderson DG (2019) Strategies, Design, and Chemistry in siRNA Delivery Systems. *Adv Drug Deliv Rev* 144:133–147
31. Drabovich AP, Pavlou MP, Dimitromanolakis A, Diamandis EP (2012) Quantitative Analysis of Energy Metabolic Pathways in MCF-7 Breast Cancer Cells by Selected Reaction Monitoring Assay. *Mol Cell Proteomics* 11:422–434

32. Erion MD, van Poelje PD, Dang Q, Kasibhatla SR, Potter SC, Reddy MR, Reddy KR, Jiang T, Lipscomb WN (2005) MB06322 (CS-917): A potent and selective inhibitor of fructose 1,6-bisphosphatase for controlling gluconeogenesis in type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7970–7975
33. Ernst O, Zor T (2010) Linearization of the Bradford Protein Assay. *J Vis Exp*
34. Evans WH, Hood DO, Gurd JW (1973) Purification and properties of a mouse liver plasma-membrane glycoprotein hydrolysing nucleotide pyrophosphate and phosphodiester bonds. *Biochem J* 135:819–826
35. Faust M, Schuster N, Montenarh M (1999) Specific binding of protein kinase CK2 catalytic subunits to tubulin. *FEBS Lett* 462:51–56
36. Forbes JM, Cooper ME (2013) Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93:137–188
37. Fu Z, Gilbert ER, Liu D (2013) Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr Diabetes Rev* 9:25–53
38. Gibson SA, Benveniste EN (2018) Protein Kinase CK2: An Emerging Regulator of Immunity. *Trends Immunol* 39:82–85
39. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, O’Meara MJ, Rezelj VV, Guo JZ, Swaney DL, Tummino TA, Hüttenhain R, Kaake RM, Richards AL, Tutuncuoglu B, Foussard H, Batra J, Haas K, Modak M, Kim M, Haas P, Polacco BJ, Braberg H, Fabius JM, Eckhardt M, Soucheray M, Bennett MJ, Cakir M, McGregor MJ, Li Q, Meyer B, Roesch F, Vallet T, Mac Kain A, Miorin L, Moreno E, Naing ZC, Zhou Y, Peng S, Shi Y, Zhang Z, Shen W, Kirby IT, Melnyk JE, Chorba JS, Lou K, Dai SA, Barrio-Hernandez I, Memon D, Hernandez-Armenta C, Lyu J, Mathy CJP, Perica T, Pilla KB, Ganesan SJ, Saltzberg DJ, Rakesh R, Liu X, Rosenthal SB, Calviello L, Venkataramanan S, Liboy-Lugo J, Lin Y, Huang X-P, Liu Y, Wankowicz SA, Bohn M, Safari M, Ugur FS, Koh C, Savar NS, Tran QD, Shengjuler D, Fletcher SJ, O’Neal MC, Cai Y, Chang JCJ, Broadhurst DJ, Klippsten S, Sharp PP, Wenzell NA, Kuzuoglu-Ozturk D, Wang H-Y, Trenker R, Young JM, Cavero DA, Hiatt J, Roth TL, Rathore U, Subramanian A, Noack J, Hubert M, Stroud RM, Frankel AD, Rosenberg OS, Verba KA, Agard DA, Ott M, Emerman M, Jura N, von Zastrow M, Verdin E, Ashworth A, Schwartz O, d’Enfert C, Mukherjee S, Jacobson M, Malik HS, Fujimori DG, Ideker T, Craik CS, Floor SN, Fraser JS, Gross JD, Sali A, Roth BL, Ruggero D, Taunton J, Kortemme T, Beltrao P, Vignuzzi M, García-Sastre A, Shokat KM, Shoichet BK, Krogan NJ (2020) A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* 583:459–468
40. Götz C, Montenarh M (2017) Protein kinase CK2 in development and differentiation. *Biomed Rep* 6:127–133
41. Grasmann G, Smolle E, Olschewski H, Leithner K (2019) Gluconeogenesis in cancer cells – repurposing of a starvation-induced metabolic pathway? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1872:24–36
42. Green MR, Sambrook J (2019) Amplification of cDNA Generated by Reverse Transcription of mRNA: Two-Step Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Cold Spring Harb Protoc* 2019:pdb.prot095190
43. Han H-S, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo S-H (2016) Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med* 48:e218

44. Hans Konrad Biesalski, Peter Grimm, Susanne Nowitzki-Grimm E (2020) Taschenatlas Ernährung. Hrsg. 8., vollständig überarbeitete Auflage edition. Thieme, Stuttgart
45. Hansen A (2004) Primerdesign. Birkhäuser, Basel. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7855-5_9
46. Hauk A (2013) Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biologie in unserer Zeit* 43:278–278
47. Hay N (2016) Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 16:635–649
48. Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB (2000) Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49:424–430
49. Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB (2000) Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49:424–430
50. Huang Q, Tan Y, Yin P, Ye G, Gao P, Lu X, Wang H, Xu G (2013) Metabolic Characterization of Hepatocellular Carcinoma Using Nontargeted Tissue Metabolomics. *Cancer Res* 73:4992–5002
51. Hunter RW, Hughey CC, Lantier L, Sundelin EI, Peggie M, Zeqiraj E, Sicheri F, Jessen N, Wasserman DH, Sakamoto K (2018) Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase. *Nat Med* 24:1395–1406
52. J. Rassow u. a. E (2016) Duale Reihe Biochemie. Hrsg. 4. Auflage edition. Thieme, Stuttgart
53. Jennings RE, Berry AA, Strutt JP, Gerrard DT, Hanley NA (2015) Human pancreas development. *Development* 142:3126–3137
54. Kanai S, Shimada T, Narita T, Okabayashi K (2019) Phosphofruktokinase-1 and fructose bisphosphatase-1 in canine liver and kidney. *J Vet Med Sci* 81:1515–1521
55. Kebede M, Favaloro J, Gunton JE, Laybutt DR, Shaw M, Wong N, Fam BC, Aston-Mourney K, Rantzaou C, Zulli A, Proietto J, Andrikopoulos S (2008) Fructose-1,6-bisphosphatase overexpression in pancreatic beta-cells results in reduced insulin secretion: a new mechanism for fat-induced impairment of beta-cell function. *Diabetes* 57:1887–1895
56. Kim Tiam S, Comte K, Dalle C, Duval C, Pancrace C, Gugger M, Marie B, Yéprémian C, Bernard C (2019) Development of a new extraction method based on high-intensity ultrasonication to study RNA regulation of the filamentous cyanobacteria *Planktothrix*. *PLoS ONE* 14:e0222029
57. Kück U, Herausgeber (2005) PCR-Analytik. Springer, Berlin, Heidelberg. URL: https://doi.org/10.1007/3-540-26469-8_4
58. Lan H, Rabaglia ME, Stoehr JP, Nadler ST, Schueler KL, Zou F, Yandell BS, Attie AD (2003) Gene expression profiles of nondiabetic and diabetic obese mice suggest a role of hepatic lipogenic capacity in diabetes susceptibility. *Diabetes* 52:688–700

59. Laybutt DR, Sharma A, Sgroi DC, Gaudet J, Bonner-Weir S, Weir GC (2002) Genetic regulation of metabolic pathways in beta-cells disrupted by hyperglycemia. *J Biol Chem* 277:10912–10921
60. Leiser J, Blum JJ (1984) Effects of VIP and forskolin on alanine metabolism in isolated hepatocytes. *FEBS Lett* 173:407–413
61. Lettieri A, Borgo C, Zanieri L, D'Amore C, Oleari R, Paganoni A, Pinna LA, Cariboni A, Salvi M (2019) Protein Kinase CK2 Subunits Differentially Perturb the Adhesion and Migration of GN11 Cells: A Model of Immature Migrating Neurons. *Int J Mol Sci* 20:
62. Lian H, Su M, Zhu Y, Zhou Y, Soomro SH, Fu H (2019) Protein Kinase CK2, a Potential Therapeutic Target in Carcinoma Management. *Asian Pac J Cancer Prev* 20:23–32
63. Liao K, Deng S, Xu L, Pan W, Yang S, Zheng F, Wu X, Hu H, Liu Z, Luo J, Zhang R, Kuang D-M, Dong J, Wu Y, Zhang H, Zhou P, Bei J-X, Xu Y, Ji Y, Wang P, Ju H-Q, Xu R-H, Li B (2020) A Feedback Circuitry between Polycomb Signaling and Fructose-1, 6-Bisphosphatase Enables Hepatic and Renal Tumorigenesis. *Cancer Res* 80:675–688
64. Liberti MV, Locasale JW (2016) The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* 41:211–218
65. Licciardello MP, Workman P (2021) A New Chemical Probe Challenges the Broad Cancer Essentiality of CK2. *Trends Pharmacol Sci* 42:313–315
66. Litchfield DW (2003) Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* 369:1–15
67. Liu M-F, Du C-K, Su X-Y (2019) Forskolin induced remodeling of lipid droplets in rat adipocytes. *Sheng Li Xue Bao* 71:379–387
68. Lou DY, Dominguez I, Toselli P, Landesman-Bollag E, O'Brien C, Seldin DC (2008) The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* 28:131–139
69. Lu T-S, Yiao S-Y, Lim K, Jensen RV, Hsiao L-L (2010) Interpretation of biological and mechanical variations between the Lowry versus Bradford method for protein quantification. *N Am J Med Sci* 2:325–328
70. Maddux BA, Sbraccia P, Kumakura S, Sasson S, Youngren J, Fisher A, Spencer S, Grupe A, Henzel W, Stewart TA (1995) Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 373:448–451
71. Maddux BA, Goldfine ID (2000) Membrane glycoprotein PC-1 inhibition of insulin receptor function occurs via direct interaction with the receptor alpha-subunit. *Diabetes* 49:13–19
72. Marshak DR, Carroll D (1991) Synthetic peptide substrates for casein kinase II. *Methods Enzymol* 200:134–156
73. Melkonian EA, Asuka E, Schury MP (2021) Physiology, Gluconeogenesis. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541119/>
74. Meng R, Al-Quobaili F, Müller I, Götz C, Thiel G, Montenarh M (2010) CK2 phosphorylation of Pdx-1 regulates its transcription factor activity. *Cell Mol Life Sci* 67:2481–2489

75. Montenarh M (2014) Protein Kinase CK2 and Angiogenesis. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 23:153–158
76. Nam HK, Liu J, Li Y, Kragor A, Hatch NE (2011) Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (ENPP1) protein regulates osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 286:39059–39071
77. Nitschke Y, Yan Y, Buers I, Kintziger K, Askew K, Rutsch F (2018) ENPP1-Fc prevents neointima formation in generalized arterial calcification of infancy through the generation of AMP. *Exp Mol Med* 50:1–12
78. Norris JM, Johnson RK, Stene LC (2020) Type 1 diabetes—early life origins and changing epidemiology. *Lancet Diabetes Endocrinol* 8:226–238
79. Pagliara AS, Karl IE, Keating JP, Brown BI, Kipnis DM (1972) Hepatic fructose-1,6-diphosphatase deficiency. A cause of lactic acidosis and hypoglycemia in infancy. *J Clin Invest* 51:2115–2123
80. Pascale RM, Calvisi DF, Simile MM, Feo CF, Feo F (2020) The Warburg Effect 97 Years after Its Discovery. *Cancers (Basel)* 12:
81. Pilkis SJ, El-Maghrabi MR, Pilkis J, Claus T (1981) Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *J Biol Chem* 256:3619–3622
82. Redmile-Gordon MA, Armenise E, White RP, Hirsch PR, Goulding KWT (2013) A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biol Biochem* 67:166–173
83. Reinard T (2010) *Molekularbiologische Methoden*. Ulmer
84. Roberts F, Zhu D, Farquharson C, Macrae VE (2019) ENPP1 in the Regulation of Mineralization and Beyond. *Trends in Biochemical Sciences* 44:616–628
85. Röder PV, Wu B, Liu Y, Han W (2016) Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med* 48:e219
86. Salvi M, Borgo C, Pinna LA, Ruzzene M (2021) Targeting CK2 in cancer: a valuable strategy or a waste of time? *Cell Death Discov* 7:325
87. Schmidt AM (2018) Highlighting Diabetes – the Epidemic Continues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38:e1–e8
88. Schreiber JR, Balcavage WX, Morris HP, Pedersen PL (1970) Enzymatic and spectral analysis of cytochrome oxidase in adult and fetal rat liver and Morris hepatoma 3924A. *Cancer Res* 30:2497–2501
89. Schuster N, Götz C, Faust M, Schneider E, Prowald A, Jungbluth A, Montenarh M (2001) Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity. *Journal of Cellular Biochemistry* 81:172–183
90. Scott LJ, Delautier D, Meerson NR, Trugnan G, Goding JW, Maurice M (1997) Biochemical and molecular identification of distinct forms of alkaline phosphodiesterase I expressed on the apical and basolateral plasma membrane surfaces of rat hepatocytes. *Hepatology* 25:995–1002

91. Silva-Pavez E, Tapia JC (2020) Protein Kinase CK2 in Cancer Energetics. *Front Oncol* 10:893
92. Spohrer S, Groß R, Nalbach L, Schwind L, Stumpf H, Menger MD, Ampofo E, Montenarh M, Götz C (2017) Functional interplay between the transcription factors USF1 and PDX-1 and protein kinase CK2 in pancreatic β -cells. *Sci Rep* 7:
93. Stefan C, Jansen S, Bollen M (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 30:542–550
94. Strillacci A, Griffoni C, Valerii MC, Lazzarini G, Tomasi V, Spisni E (2010) RNAi-Based Strategies for Cyclooxygenase-2 Inhibition in Cancer. *J Biomed Biotechnol* 2010:
95. Tian H, Zhu X, Lv Y, Jiao Y, Wang G (2020) Glucometabolic Reprogramming in the Hepatocellular Carcinoma Microenvironment: Cause and Effect. *Cancer Manag Res* 12:5957–5974
96. Tillmann H, Eschrich K (1998) Isolation and characterization of an allelic cDNA for human muscle fructose-1,6-bisphosphatase. *Gene* 212:295–304
97. Timson DJ (2019) Fructose 1,6-bisphosphatase: getting the message across. *Biosci Rep* 39:
98. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A (2018) The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol* 217:2273–2289
99. Tumurbaatar B, Poole AT, Olson G, Makhlof M, Sallam HS, Thukuntla S, Kankanala S, Ekhaese O, Gomez G, Chandalia M, Abate N (2017) Adipose Tissue Insulin Resistance in Gestational Diabetes. *Metab Syndr Relat Disord* 15:86–92
100. Völcker M Victoria (2019) Identifikation und Funktionsanalyse neuer CK2-abhängiger Zielmoleküle in pankreatischen β -Zellen.
101. Walker JM (1996) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Science & Business Media
102. Wang Y, Lv Z, Chen F, Wang X, Gou S (2021) Discovery of 5-(3-Chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine Derivatives as Highly Selective CK2 Inhibitors with Potent Cancer Cell Stemness Inhibition. *J Med Chem* 64:5082–5098
103. Warshauer JT, Bluestone JA, Anderson MS (2020) New frontiers in the treatment of Type 1 diabetes. *Cell Metab* 31:46–61
104. Wells CI, Drewry DH, Pickett JE, Tjaden A, Krämer A, Müller S, Gyenis L, Menyhart D, Litchfield DW, Knapp S, Axtman AD (2021) Development of a potent and selective chemical probe for the pleiotropic kinase CK2. *Cell Chem Biol* 28:546-558.e10
105. Yáñez AJ, Bertinat R, Spichiger C, Carcamo JG, García M de los A, Concha II, Nualart F, Slebe JC (2005) Novel expression of liver FBPase in Langerhans islets of human and rat pancreas. *Journal of Cellular Physiology* 205:19–24
106. Yang J, Jin X, Yan Y, Shao Y, Pan Y, Roberts LR, Zhang J, Huang H, Jiang J (2017) Inhibiting histone deacetylases suppresses glucose metabolism and hepatocellular carcinoma growth by restoring FBP1 expression. *Sci Rep* 7:43864
107. Youngren JF (2007) Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 64:873–891

108. Zakharia K, Miyabe K, Wang Y, Wu D, Moser CD, Borad MJ, Roberts LR (2018) Preclinical In Vitro and In Vivo Evidence of an Antitumor Effect of CX-4945, a Casein Kinase II Inhibitor, in Cholangiocarcinoma. *Transl Oncol* 12:143–153
109. Zeng K-W, Wang J-K, Wang L-C, Guo Q, Liu T-T, Wang F-J, Feng N, Zhang X-W, Liao L-X, Zhao M-M, Liu D, Jiang Y, Tu P (2021) Small molecule induces mitochondrial fusion for neuroprotection via targeting CK2 without affecting its conventional kinase activity. *Signal Transduct Target Ther* 6:71
110. Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, Nusinow DA, Sun X, Landais S, Kodama Y, Brenner DA, Montminy M, Kay SA (2010) Cryptochrome Mediates Circadian Regulation of cAMP Signaling and Hepatic Gluconeogenesis. *Nat Med* 16:1152–1156
111. Zhang Y, Xie Z, Zhou G, Zhang H, Lu J, Zhang WJ (2010) Fructose-1,6-bisphosphatase regulates glucose-stimulated insulin secretion of mouse pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 151:4688–4695
112. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167–1174

8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Claudia Götz für die Bereitstellung des Themas und die Schirmherrschaft und die Betreuung meiner Arbeit bedanken. Mit Rat, Tat und Diskussionsbereitschaft hat sie maßgeblich zum Gelingen meines Wirkens beigetragen.

Danke für die Herzlichkeit und die stetige Motivation.

Ein besonderer Dank gilt auch Herr Prof. Dr. Mathias Montenarh für die wertvollen Ratschläge und gelegentlichen produktiven Denkanstöße.

Außerdem möchte ich mich auch bei Michelle Völcker für die Bereitstellung von Proben, sowie die Einarbeitung in die Forschungsthematik und den Laboralltag bedanken. Mit viel Zeit und Geduld vermittelte sie mir die notwendige Methodik und Arbeitsweisen.

Auch bei Dr. Beate Schmitt möchte ich mich herzlich bedanken. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine teils banalen Anliegen. Mithilfe ihrer geduldigen Art trug sie zum Erfolg meiner molekularbiologischen Untersuchungen bei.

Der Arbeitsgruppe von Herr PD Dr. Emanuel Ampofo möchte ich für die freundliche Aufnahme und die sehr guten Gesprächen mit immer guten Ideen zwecks erfolgreicher Weiterführung des Themas danken.

Die Zusammenarbeit war mir immer eine außerordentliche Freude, bei der ich sehr viel wissenschaftlich und menschlich lernen konnte.

Danke auch meinen Freunden, ob von früher oder erst durch die Arbeit im Labor hinzugewonnen, für die schöne Zeit und Motivation in jeder Lebenslage.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen. Ohne ihre Unterstützung und Ermutigung während des gesamten Studiums wäre mir dieser Weg nicht möglich gewesen.

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

Ort, Datum

Unterschrift des Promovierenden
