

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. Gudermann

Untersuchung zur Beteiligung von Proteinkinase A und
Tyrosinkinasen an der Calcium-abhängigen Signaltransduktion
von Glucagon-like Peptide 1(7-36)amid in Insulin-sezernierenden
Zellen des endokrinen Pankreas

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Birgit Moormann

aus Nordhorn

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 28. Juli 2005

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Professor Dr. Maisch

Referent: Privatdozent Dr. H.-P. Bode

Korreferent: Professor Dr. R. Göke

gewidmet meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7-39
1.1 Die Glukosehomöostase und das Pankreas	7
1.2 Das Inkretinkonzept	12
1.3 Glucagon-like Peptide 1(7-37) und Glucagon-like Peptide 1(7-36) amid – GLP-1	14
1.4 Der GLP-1-Rezeptor	16
1.5 Metabolismus und Wirkung von GLP-1	18
1.6 GLP-1 und sein therapeutischer Nutzen bei Diabetes mellitus	22
1.7 Bedeutung von Calcium als Second messenger in der Signaltransduktion	24
1.7.1 Regulierung der zytosolischen Calciumkonzentration und ihre Bedeutung für die Signaltransduktion	25
1.8 Bedeutung von Proteinkinasen für die Signaltransduktion	28
1.9 Signaltransduktion des GLP-1: Zum Stand der Forschung	32
1.10 Beschreibung hier verwendeten β -Zellmodells	36
1.11 Ziel und experimentelle Durchführung der vorliegenden Studie	38
2. Materialien und Methoden	40-67
2.1 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Geräte	40
2.1.1 Zellkultur der INS-1-Zellen	40
2.1.2 Präparation der Langerhansschen Inseln	40
2.1.3 Zellkultur der Langerhansschen Inseln	41
2.1.4 Fluoreszenzindikatoren	41
2.1.5 Pufferlösungen	41
2.1.6 Reagenzien zur Kalibrierung der Messungen der INS-1-Zellen	42
2.1.7 Reagenzien zur Kalibrierung der Messungen der Langerhans- schen Inseln	42
2.1.8 Messreagenzien	43
2.1.9 Geräte für die Zellkultur von INS-1-Zellen und Insel-Zellen	43
2.1.10 Zentrifugen	43
2.1.11 Fluoreszenzspektrometer	44

2.1.12 Fluoreszenzmikroskop	44
2.2 Materialbezug	44
2.3 Methoden	46
2.3.1 Zellkultivierung der INS-1-Zellen	46
2.3.2 Intrazelluläre Calciummessung mit dem Fluoreszenzindikator Fura-2	47
2.3.3 Messung der zytosolischen Calciumkonzentrationen bei Zellen der β -Zelllinie INS-1	50
2.3.4 Membranpotentialmessungen an INS-1-Zellen mit dem Fluoreszenzindikator Bisoxonol	53
2.3.5 Präparation und Kultivierung von Langerhansschen Inseln aus DBA/2-Mäusen	55
2.3.6 Messung der zytosolischen Calciumkonzentrationen in Langerhansschen Inseln mit einem digitalen Fluoreszenzmikroskop	57
2.3.7 Eigenschaften der verwendeten Substanzen	60
2.3.7.1 Forskolin	60
2.3.7.2 KT 5720	62
2.3.7.3 Rp-cAMPs versus Sp-cAMPs	62
2.3.7.4 H-89	63
2.3.7.5 Genistein / Daidzein	64
2.3.7.6 Herbimycin A	66
2.3.7.7 Staurosporin	66
3. Ergebnisse	68-114
3.1 Reaktion der INS-1-Zellen und β -Zellen der Langerhansschen Inseln auf GLP-1 und Forskolin	68
3.1.1 Verhalten der INS-1-Zellen auf GLP-1- und Forskolin-Gabe anhand der Messung der intrazelluläre Calciumkonzentration mit Fura-2 am Fluoreszenzspektrometer	68
3.1.2 Messungen des Membranpotentials der INS-1-Zellen bei Stimulation mit GLP-1 und Forskolin anhand von Bisoxonol am Fluoreszenzspektrometer	70

3.1.3 Verhalten der intrazellulären Calciumkonzentration der Langerhansschen Inseln bei Änderung der Glukosekonzentration am Fluoreszenzmikroskop	71
3.1.4 Effekte von GLP-1 und Forskolin auf den intrazellulären Calciumspiegel der Langerhansschen Inseln am Fluoreszenzmikroskop	73
3.2 Wirkung verschiedener selektiver Proteinkinase A Hemmstoffe auf die GLP-1- und Forskolin-induzierten Effekte an INS-1-Zellen und Langerhansschen Inseln	76
3.2.1 Messungen mit KT5720 als Hemmstoff der Proteinkinase A	76
3.2.2 Messungen mit Rp-cAMPs als Hemmstoff der Proteinkinase A	79
3.2.3 Messungen mit H-89 als Hemmstoff der Proteinkinase A	86
3.3 Untersuchung verschiedener selektiver Tyrosinkinase-Hemmstoffe auf die GLP-1- und Forskolin-bedingten Effekte an INS-1-Zellen und Langerhansschen Inseln	93
3.3.1 Messungen mit Genistein als Hemmstoff der Tyrosinkinasen	93
3.3.2 Messungen mit Herbimycin A als Hemmstoff der Tyrosinkinasen	101
3.4 Wirkung des unspezifischen Proteinkinasehemmstoffes Staurosporin auf die GLP-1- und Forskolin-induzierten Effekte an INS-1-Zellen und Langerhansschen Inseln	105
4. Diskussion	115-141
4.1 Interpretation der Ergebnisse der Proteinkinase A-Hemmstoffe	115
4.1.1 Effekt von KT5720 auf die GLP-1-vermittelte Calciumerhöhung und Membrandepolarisation	116
4.1.2 Effekt von Rp-cAMPs auf die GLP-1-vermittelte Calciumerhöhung und Membrandepolarisation	117
4.1.3 Effekt von H-89 auf die GLP-1-vermittelte Calciumerhöhung und Membrandepolarisation	120
4.2 Interpretation der Ergebnisse der Tyrosinkinase-Hemmstoffe	121
4.2.1 Effekt von Genistein auf die GLP-1-vermittelte Calciumerhöhung und Membrandepolarisation	122

4.2.2 Effekt von Herbimycin A auf die GLP-1-vermittelte Calciumerhöhung und Membrandepolarisation	126
4.3 Interpretation der Ergebnisse von Staurosporin als unselektivem Proteinkinasehemmstoff	127
4.4 Schlussfolgerungen für die mögliche Mechanismen der Calcium-abhängigen Signaltransduktion von Glucagon-like Peptide 1(7-36) amid in Insulin-sezernierenden Zellen des endokrinen Pankreas	129
4.4.1 Der ATP-abhängig Kaliumkanal	129
4.4.2 Nicht selektive Kationenkanäle	133
4.4.3 Der für zyklische Nukleotide sensitive, hyperpolarisations-aktivierte nicht selektive Kationenkanal HCN	134
4.4.4 Der L-Typ spannungsabhängige Calciumkanal	135
4.4.5 Intrazelluläre Calciumspeicher	136
4.4.6 Der cAMP-regulierten Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor Epac	137
4.5 Allgemeine Schlussfolgerungen für die GLP-1-induzierte Insulinsekretion	139
5. Zusammenfassung	142
6. Abkürzungen	144
7. Literaturverzeichnis	145
8. Anhang	167
Lebenslauf	167
Verzeichnis der akademischen Lehrer	168
Danksagung	169
Ehrenwörtliche Erklärung	170

1. Einleitung

1.1 Insulin und der Glukosestoffwechsel

Glukose ist der zentrale Energieträger des menschlichen Stoffwechsels. Die Blutglukosekonzentration steht daher im Mittelpunkt des Energiestoffwechsels. Unter normalen Bedingungen liegt der Nüchternblutzuckerspiegel beim Menschen zwischen 70-100mg/dl. Genau wie zu niedrige Blutzuckerwerte zu einer Mangelversorgung in bestimmten Zellarten, wie im Gehirn, führen, kann es durch einen erhöhten Blutzuckerspiegel zu Schäden an verschiedenen Organen, wie unter anderem den Nieren, Gefäßen und Nerven, kommen [Silbernagl et al., 1991; Herold, 2002]. Langfristige Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels führen entsprechend zu einer Vielzahl von Folgeschäden. Die bekannteste und häufigste Erkrankung des Glukosehaushaltes ist der „Diabetes mellitus“.

Wichtigstes Organ bei der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase ist der endokrine Anteil des Pankreas. Dies ist ein Zusammenschluss aus den ca. 1,5 Millionen Langerhansschen Inseln, die mit ca. 1-2g nur 1,5% des gesamten Pankreasgewichtes ausmachen und sich vor allem im Körper- und Schwanzbereich des Pankreas befinden. Die Langerhansschen Inseln spielen die entscheidende Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel und bestehen aus mindestens vier funktionell und immunhistochemisch verschiedenen Zelltypen. Die α -Zellen liegen in der Inselperipherie, machen etwa 20% ihres Volumens aus und sezernieren zwei Hormone, Glukagon und das gastrisch inhibierende Polypeptid (GIP).

Glukagon führt zu einer vermehrten Glykogenolyse und einer gesteigerten Glukoneogenese aus Laktat, Aminosäuren sowie Glycerol und wirkt größtenteils antagonistisch zu Insulin. GIP ist ein Inkretinhormon, dessen Bedeutung im nächsten Abschnitt der Einleitung näher beschrieben wird. Mit 70-90% machen die β -Zellen der Hauptanteil der Langerhansschen Inseln aus. Sie befinden sich vor allem im Zentrum der Insel und produzieren Insulin. Zusätzlich kommen in kleiner Zahl die δ -Zellen, die Somatostatin bilden, und die pankreatisches Polypeptid-bildenden Zellen (PP-Zellen) vor. Somatostatin hemmt die Freisetzung von Insulin und Glukagon [Junqueira et al.,

1991; Kreutzig, 1993; Silbernagl et al., 1991]. Die verschiedenen Zellen der Langerhansschen Inseln beeinflussen sich parakrin über eine direkte Wirkung der freigesetzten Hormone und sind zudem untereinander elektrisch über so genannte Gap junctions verbunden [Valdeolmillos et al., 1993; Meda et al., 1986].

Entscheidend für die Senkung des Blutzuckerspiegels ist das Peptidhormon Insulin der β -Zellen. Insulin besteht aus 51 Aminosäuren (AS) und enthält zwei Peptidketten [Kette A (21 AS) und B (30 AS)], die durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es entsteht durch Heraus trennen der C-Kette aus dem Proinsulin, welches aus einer einzigen, 84 Aminosäuren enthaltenden Kette besteht. Der tägliche Insulinbedarf des Menschen liegt bei 1,5mg, was 35 Insulineinheiten (IE) $\hat{=}$ 45 μ g kristallinen Insulins entsprechen [Kreutzig, 1993].

Die Hauptaufgabe des Insulins liegt in einer Senkung der Blutglukosekonzentration. Es wirkt dabei vor allem auf die insulinabhängigen Gewebe wie die Leber, den Muskel und das Fettgewebe. Hier erhöht es die Aufnahme von Monosacchariden, Aminosäuren und Fettsäuren in die Zelle. Durch Aktivierung der Schlüsselenzyme steigert Insulin die Glykolyse, den Pentosephosphatweg sowie die Glykogensynthese und hemmt die Glukoneogenese. Zusätzlich erhöhen sich die Protein- und die Fettsäuresynthese, während die Lipolyse gehemmt wird. Es gibt auch Organe mit einem insulinunabhängigen Stoffwechsel wie das Gehirn, Erythrozyten und das lymphatische Gewebe, die somit von einem Insulinmangel nicht direkt betroffen sind [Kreutzig, 1993].

Hauptreiz für die Insulinausschüttung ist der Anstieg der Blutglukose. Jede Erhöhung der Blutglukosekonzentration über den Grenzwert von etwa 5mM führt zu einer Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration (siehe Abbildung 1.1). Glukose wird über den sehr effektiven GLUT2-Transporter in die β -Zelle aufgenommen. Hier erfolgt als erster Schritt der Glykolyse die ATP-abhängige Phosphorylierung der Glukose durch eine Hexokinase, die Glukokinase, so dass Glukose-6-Phosphat entsteht. Diese Hexokinase gilt als Glukosesensor und ist der limitierender Faktor im Glukosemetabolismus sowie der Insulinsekretion der Zelle. Durch die weiteren Schritte der Glykolyse entsteht im Zytoplasma Pyruvat, das in die Mitochondrien transportiert wird. Hier wird aus Pyruvat durch oxidative Decarboxylierung Azetyl-CoA gebildet,

dass in den Zitronensäurezyklus eingeschleust und oxidiert wird. Durch das entstehende $\text{NADH} + \text{H}^+$ wird in der Atmungskette Adenosin-5'-triphosphat, ATP, erzeugt [Kreutzig, 1993; Maechler et al., 2000; Kennedy et al., 2002].

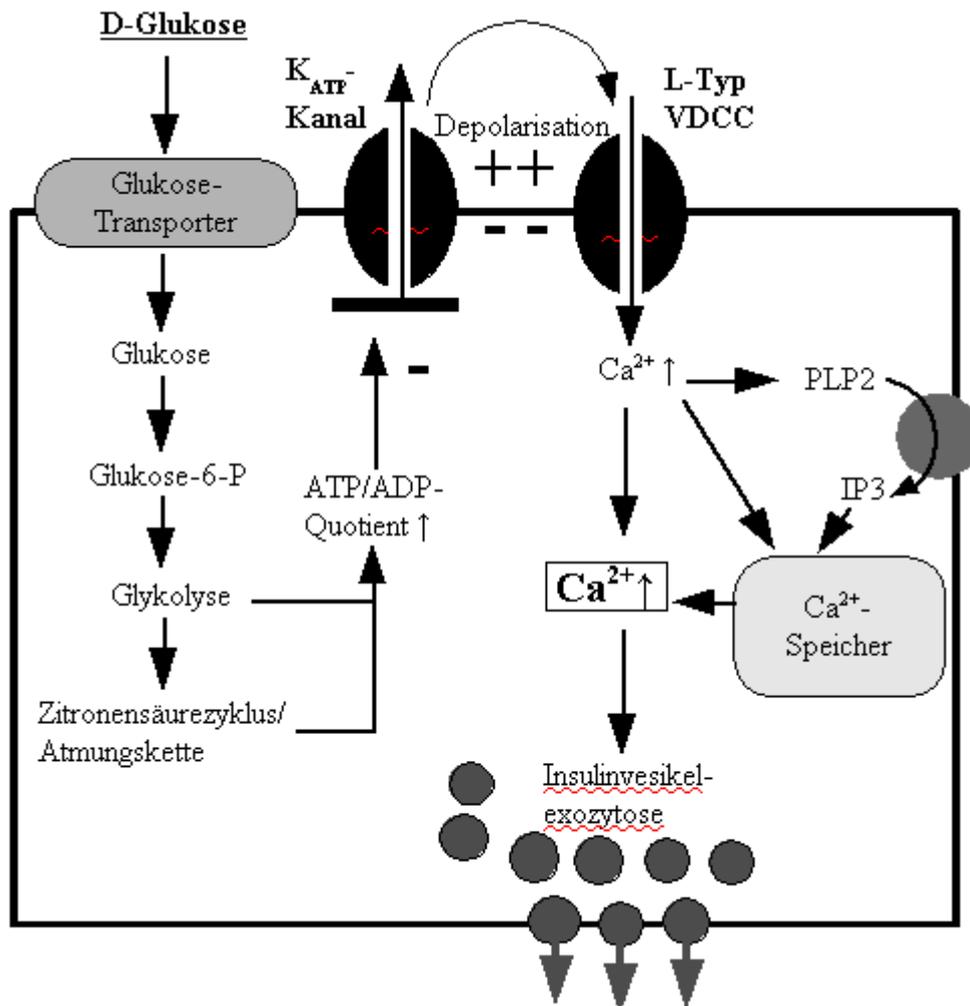


Abbildung 1.1: Glukose-induzierte Insulinfreisetzung

Neben der in Text beschriebenen Aktivierung der L-Typ spannungsabhängigen Calciumkanäle (VDCC) über die Schließung ATP-abhängiger Kaliumkanäle (K_{ATP}^+ -Kanal) kommt es durch den anfänglichen Calciumeinstrom durch die VDCC's zu einer Stimulierung der Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat (PLP2) zu Inositoltrisphosphat (IP3) hydrolysiert, welches Calcium aus IP-3-abhängigen intrazellulären Calciumspeichern freisetzt und damit die Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) weiter anhebt. Durch die erhöhte zytosolische Calciumkonzentration wird die Insulinfreisetzung bewirkt [Holz et al., 1997].

Somit führt der Metabolismus von Glukose zu einer Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten in der β -Zelle, was die Schließung von so genannten ATP-sensitiven Kaliumkanälen (K_{ATP}^+ -Kanal) bewirkt. Der für die Aufrechterhaltung des

Membranpotentials notwendige Kaliumausstrom versiegt. Sind mehr als 90% der K^+ _{ATP}-Kanäle blockiert, kann das Membranpotential nicht mehr aufrecht erhalten werden und es kommt zur Depolarisation der Plasmamembran. Dadurch können sich die so genannten L-Typ spannungsabhängigen Calciumkanäle (voltage-dependent Ca^{2+} -channels, VDCC) öffnen, so dass Calcium in die Zelle strömt. Die Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration ist der Hauptauslöser für die Exozytose der Insulinenthaltenden Granula [Ashcroft et al., 1989; Rorsman, 1997]. Der genaue Mechanismus, über den die Erhöhung der Calciumkonzentration die Exozytose bewirkt, ist im Detail noch nicht bekannt. Eine mögliche Einflussnahme wäre die Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMK II). Die CaMK II phosphoryliert Proteine, wie zum Beispiel in Nervenzellen Synapsin I, die den Granulattransport zur Zellmembran regulieren [Ashcroft, 1994].

Die Glukose-induzierte Veränderung des Calciumspiegels ist triphasisch, beginnend mit einer kleinen und sehr kurzen Absenkung der Calciumkonzentration. Diese Erniedrigung konnte durch Thapsigargin unterdrückt werden. Thapsigargin ist ein spezifische Hemmstoff für die ATP-abhängigen Calciumpumpen des endoplasmatischen Retikulums (SERCA), so dass sich die intrazellulären Calciumspeicher schnell entleeren und eine erneute Aufnahme von Calcium verhindert wird. Die kleine initiale Absenkung scheint somit durch eine Sequestrierung von Calcium in intrazelluläre Organellen, wie das endoplasmatische Retikulum, bedingt zu sein [Roe et al., 1994; Gilon et al., 1994]. Im weiteren zeigt die Glukose-induzierte Calciumerhöhung einem großen, kurzen Peak als zweite Phase und eine nachfolgende, dritte, andauernden Plateauphase durch Öffnung der oben beschriebenen L-Typ spannungsabhängigen Calciumkanäle [Henquin et al., 2002].

Die Insulinsekretion selbst ist biphasisch parallel zur Calciumerhöhung [Henquin et al., 2002]. Die Insulingranula in der Zelle sind in zwei verschiedene Gruppen aufgeteilt (siehe Abbildung 1.2). Einen direkt zur Exozytose bereitstehende Anteil und eine so genannten Reservepool. Die Zeit zwischen dem Öffnen der Calciumkanäle und der Exozytose ist mit 50ms sehr klein. Der Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels als Initiator führt zunächst zur ATP-unabhängigen Exozytose des Pools aus vorbereiteten Granula. cAMP-abhängig und unabhängig von Proteinkinase A kann die Exozytose

dieser bereitstehenden Granula verstärkt werden. Der so genannte „readily releasable pool“ Pool besteht aber nur aus einer kleinen Fraktion (unter 0,5%). In der zweiten Phase erfolgt die Exozytose ATP- bzw. Glukose- und Calcium-abhängigen aus dem großen Reservepool. Die Granula müssen durch Veränderung ihrer Position oder chemische Modifikationen oder beides in den Pool der unmittelbar exozytierbaren Granula gewandelt werden. Die Exozytose aus dem Reservepool scheint durch Proteinkinase A verstärkt zu werden [Rorsman, 1997; Gromada et al., 1998a; Henquin et al., 2002].

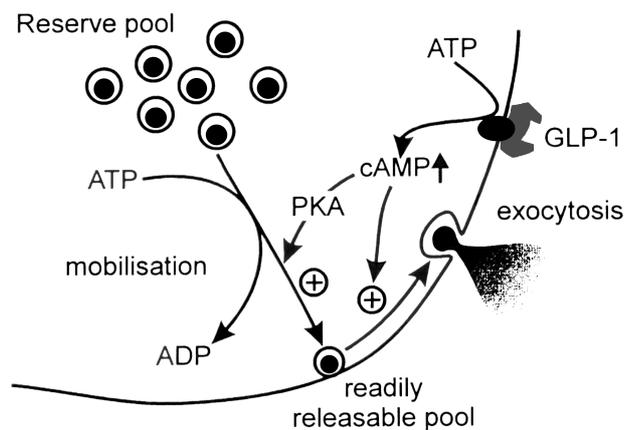


Abbildung 1.2: Verteilung der Insulingranula

In der ersten Phase der Glukose-induzierten Insulinsekretion führt der Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels ATP-unabhängigen Exozytose eines limitierten Pools von Insulingranula („readily releasable pool“). Im weiteren erfolgt die Exozytose aus einem Reservepool, dessen Granula zunächst ATP-abhängigen durch Veränderung ihrer Position oder chemische Modifikationen in den Pool der unmittelbar exozytierbaren Granula gewandelt werden müssen. Potentioren wie GLP-1 können auf verschiedenen Ebenen z. B. Proteinkinase-A-abhängig und unabhängig Einfluss auf die Exozytose ausüben [aus Gromada et al., 1998a].

Bei längerfristig erhöhten Blutzuckerwerten erfolgt beim Menschen eine pulsatile Insulinsekretion alle 6 bis 8 Minuten. Auf einen Anstieg der Glukosekonzentration wird mit einer erhöhten Amplitude des Insulinpulses reagiert. Die Calciumoszillationen der β -Zellen scheinen ein direkter Regulator für die Pulsatilität und Höhe der Insulinsekretion zu sein. So sind der Puls der Insulinsekretion und die langsamen Calciumoszillationen synchron. Insulinoszillationen unter einer Amplitude von 20%, die möglicherweise durch schnelleren Änderungen der Sekretionsrate ausgelöst werden könnten, sind technisch bedingt jedoch nicht nachweisbar [Gilon et al., 1993; Song et al., 2002]. Die genaue Entstehung dieser Oszillationen ist noch nicht geklärt. Parallel zu

den Calciumveränderungen kommt es zu oszillatorischen Membrandepolarisationen. Ein Einfluss des Metabolismus der β -Zelle wird diskutiert, auch Calcium-unabhängige Oszillationen wurden beschrieben [Kennedy et al., 2002; Gilon et al., 1992, Ravier et al., 1999].

Durch die pulsierende Form der Insulinsekretion wird die Effektivität des Insulins in der Peripherie insofern gewährleistet, als keine Rezeptordesensibilisierung entstehen kann. Der Verlust dieser Insulinoszillationen ist zum Beispiel als frühes Symptom für den Diabetes mellitus Typ2 beschrieben [Kennedy et al., 2002; Kjems et al., 2002].

Die Insulinsekretion kann auf zwei verschiedene Arten beeinflusst werden: Initiatoren wie Glukose, Aminosäuren oder auch Sulfonylharnstoffe, die an die SUR1-Untereinheit des K^+ _{ATP}-Kanal binden, schließen den oben beschriebenen K^+ _{ATP}-Kanal ohne zusätzliche Stimuli und bewirken selbstständig eine Insulinfreisetzung. Währenddessen benötigen die Potentioren zumindest einen ausreichenden Sekretionsreiz durch einen der Initiatoren. Zu den Potentioren werden Hormone wie das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), das somatotrope Hormon (STH) oder Glukagon aber auch Neurotransmitter wie Acetylcholin gezählt [Ashcroft et al., 1989; Wollheim et al., 1981].

1.2 Das Inkretinkonzept

Sinnvoll für eine Verstärkung der Insulinsekretion wäre eine Verbindung zwischen dem Magen-Darm-Trakt als Organ der Glukoseaufnahme und den Langerhansschen Inseln als Ort der Insulinsekretion. So entwickelte sich im Anfang des letzten Jahrhunderts das Inkretinkonzept durch die Erkenntnis, dass orale Glukosezufuhr größere Mengen Insulin freisetzt als eine intravenöse Zufuhr. 1906 wurde erstmals das Vorhandensein von intestinalen Substanzen beschrieben, die die Funktion des endokrinen Pankreas regulieren [Moore et al., 1906]. Ein Inkretin ist ein Hormon, das im Gastrointestinaltrakt gebildet wird, durch orale Nährstoffaufnahme ausgeschüttet wird und die Glukose-induzierte Insulinsekretion der pankreatischen β -Zellen verstärkt [Creutzfeldt, 1979]. Erst in den 60er Jahren, als Insulin im Plasma messbar wurde, konnte diese funktionelle Verbindung, die „entero-insuläre Achse“, zwischen Dünndarm

und endokrinem Pankreas bestätigt werden (siehe Abbildung 1.3) [Unger et al., 1969]. Die Insulinantwort auf orale Glukosegabe war höher und schneller als die bei einer vergleichbaren intravenösen Glukoseinjektion [McIntyre et al., 1964, Perley et al., 1967].

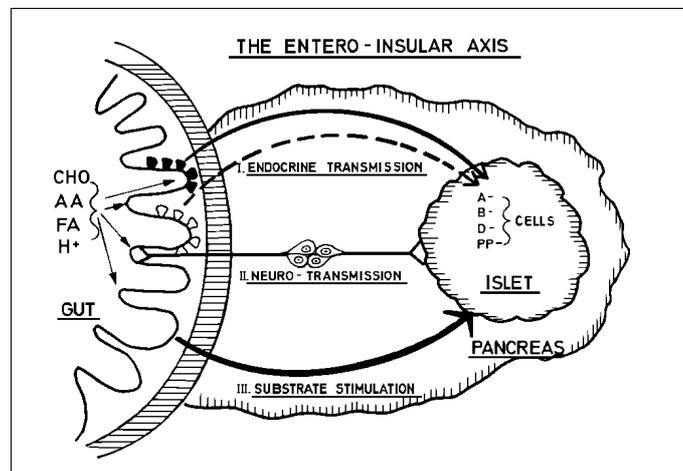


Abbildung 1.3: Die „entero-insuläre Achse“:

Der Terminus „entero-insuläre Achse“ umfasst alle Stimuli, die vom Darm auf den endokrinen Pankreas wirken. Die vom Darm ausgeschütteten Hormone („endocrine transmission“), die zur Insulinsekretion führen, werden Inkretine genannt [aus Creutzfeld et al., 1979]

Als Inkretin mit großer insulinotropen Wirkung konnte zunächst das gastrisch inhibierende Polypeptid (GIP) identifiziert werden [Creutzfeldt, 1979]. Dieses Hormon wird überwiegend in den K-Zellen des proximalen Dünndarms gebildet und nach einer genügend großen Absorption von Glukose und Aminosäuren in die Blutzirkulation abgegeben [Buchan et al., 1978]. Es bewirkt neben seines insulinotropen Effekts in der Peripherie eine vermehrte Glukoseaufnahme, scheint die Insulinaffinität der Adipozyten zu erhöhen und kann die Glukagon-induzierten Lipolyse hemmen [Meier et al., 2002]. Im Verlauf zeigte sich aber, dass in vivo-Immunneutralisierung des endogene GIP nach oraler Glukoseaufnahme die Insulinsekretion nur um ungefähr 20% verringert. GIP konnte somit nicht das einzige bzw. das stärkste Inkretinhormon sein [Ebert et al., 1982].

Heute gilt das 1986 entdeckte Glukagon-ähnliche bzw. Glucagon-like Peptide 1, GLP-1, als das stärkste insulinotrope Hormon [Mojsov et al., 1986 und 1987; Göke et al., 1991; Fehmann et al., 1995a]. Um eine ähnlich hohe Insulinsekretion zu erzielen, benötigt man eine 100-fach niedrigere Konzentration des aktiven GLP-1(7-37) im Vergleich zu GIP [Mojsov et al., 1987]. Eine Hemmung von GLP-1 durch den

Antagonisten Exendin(9-36)-amid verringerte die Insulinsekretion um ca. 60% unabhängig von der GIP-induzierten Antwort [Kolligs et al., 1995]. GIP und GLP-1 sind dabei in ihrer insulinotropen Wirkung additiv und scheinen somit die beiden intestinalen Hormone zu sein, die beim Gesunden hauptverantwortlich für den Inkretineffekt sind [Fehmann et al., 1989; Nauck et al., 1993].

1.3 Glucagon-like Peptide 1(7-37) und Glucagon-like Peptide 1(7-36)amid – GLP-1

GLP-1 gilt, wie in Kapitel 1.2 beschrieben, als das stärkste Inkretin und ist ein Produkt des Proglukagon-Gens [Bell et al., 1983; Mojsov et al., 1986]. Das Proglukagon-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosom 2 und besteht aus 6 Exons und 5 Introns [White et al., 1986]. Die messenger RNA (mRNA) des Proglukagon-Gens konnte unter anderem in intestinalen L-Zellen und in α -Zellen des Pankreas sowie im Gehirn nachgewiesen werden, wobei je nach Zellart unterschiedliche Endprodukte entstehen [Drucker et al., 1988; Göke et al., 1991].

Zunächst wird in all diesen Zellen aus dem Proglukagon-Gen über Proglukagon-mRNA und Pre-Proglukagon das Prohormon Proglukagon gebildet, welches 160 Aminosäuren (AS) enthält (siehe Abbildung 1.4). In den α -Zellen des Pankreas entsteht daraus durch posttranslationale Spaltung das „glicentin-related pancreatic peptid“ (GRPP), Glukagon, Proglukagon (AS 64-69) und das „major pankreatic proglucagon fragment“ (MPGF) (AS 72-158) [Yanaihara et al., 1985; Kieffer et al., 1999]. Nur in einem Teil der α -Zellen konnte neben Glukagon GLP-1 nachgewiesen werden [Eissele et al., 1992; Heller et al., 1995]. Währenddessen wird in den L-Zellen des Darms aus dem Proglukagon Glicentin, Oxyntomodulin, GLP-1 und GLP-2 gebildet [Thim et al., 1981; Bataille et al., 1982; Orskov et al., 1987].

Das GLP-1 (Proglukagon 78-108) besteht jetzt aus 37 Aminosäuren. Nach Abspaltung von 6 Aminosäuren des N-terminalen Endes entsteht das biologisch aktive GLP-1(7-37). Zwischen 66 und 80% des GLP-1 liegt im Körper nach Trunkierung und Amidierung am C-terminalen Ende als GLP-1(7-36)amid vor, nur um 25% als GLP-1(7-37) [Orskov et al., 1993; Mojsov et al., 1986; Wettergren et al., 1998]. Beide Peptide,

amidiert oder nicht, bewirken eine äquivalente Insulinfreisetzung und Verminderung des Blutzuckerspiegels. Die Plasma-Halbwertszeit von GLP-1(7-37) und GLP-1(7-36)amid sind ähnlich, so dass die Amidierung des C-terminalen Endes weder für die Wirkung auf das endokrine Pankreas noch für den Metabolismus von GLP-1 eine wichtige Rolle spielt [Orskov et al., 1993]. Im Weiteren wird, wenn nicht anders aufgeführt, statt GLP-1(7-36)amid von GLP-1 gesprochen, welches für die Versuche verwendet wurde.

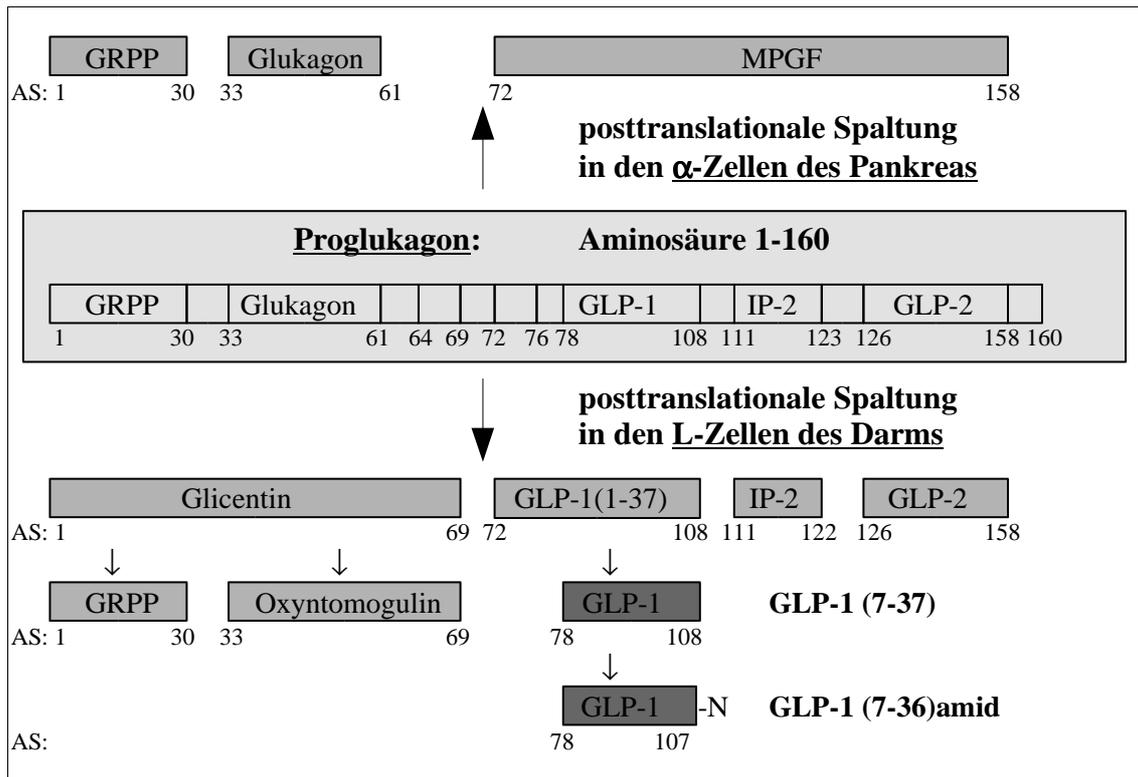


Abbildung 1.4: gewebsspezifische posttranslationale Spaltung von Proglukagon
 Abkürzungen: GRPP - „glicentin-related pancreatic peptid“, IP-2 - „inverting peptide“, MPGF - „major pancreatic proglucagon fragment“

Wichtiger für die Wirkung von GLP-1 scheint das N-terminale Ende zu sein. So sind GLP-1(8-37), nach Entfernen der ersten Aminosäure (Histidin), oder GLP-1(6-37) fast vollständig biologisch inaktiv [Gefel et al., 1990; Suzuki et al., 1989].

Untersuchungen zur Sekundärstruktur von GLP-1 zeigen, dass es entsprechend der Aminosäuresequenz große Ähnlichkeit mit Glukagon besitzt. GLP-1 setzt sich aus einem N-terminalen „random coil“ Segment (AS 1-7), zwei α -Helix Segmenten (AS 7-14 und 18-28) und einer „linker“-Region (AS 15-17) zusammen [Thornton et al., 1994].

1.4 Der GLP-1-Rezeptor

Das freigesetzte GLP-1 vermittelt seine Wirkung über einen spezifischen GLP-1-Rezeptor, dessen Existenz an einer Insulinomzelllinie der Ratte (RINm5F) 1988 beschrieben wurde [Göke R. et al., 1988]. Der GLP-1-Rezeptor besteht aus 463 Aminosäuren mit 7 hydrophoben Regionen, die jeweils durch die Zellmembran reichen [Dillon et al., 1993; Graziano et al., 1993; Thorens 1992]. An der intrazellulären Seite ist der Rezeptor an ein Guanin-Nukleotid-bindendes Protein (G-Protein) gekoppelt. Zusammen mit den Rezeptoren für Sekretin, Kalzitinin, Parathormon (PTH), vasoaktivem intestinalen Polypeptid (VIP), „growth hormone-releasing“ Hormon (GHRH) und Glukagon bildet es eine Untergruppe innerhalb der großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, denen eine große Homologie der Aminosäuresequenz und ein langes extrazelluläres N-terminales Segment gemein ist [Segre et al., 1993].

Das G-Protein ist ein Heterotrimer und setzt sich aus den 3 Untereinheiten α , β und γ zusammen. Je nach der α -Untereinheit werden unter anderem stimulierende ($G\alpha_s$) und inhibierende ($G\alpha_i$) G-Proteine unterschieden. Die Bindung von GLP-1 an der Außenseite des Rezeptors führt zu einer Änderung der Konformation an der Innenseite. So kann das entsprechende G-Protein GDP durch GTP ersetzen, woraufhin sich die α -Untereinheit des G-Proteins löst. Die α_s -Untereinheit bewirkt über das Adenylatzyklase-System eine Erhöhung der Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) im Zellinneren (siehe Abbildung 1.5) [Göke R. et al., 1988; Drucker et al., 1987; Strader et al., 1994]. Neben der Verbindung mit dem $G\alpha_s$ sind bei einigen entfernteren Zelllinien, wie den Ovarzellen des chinesischen Hamsters, auch Verbindungen des GLP-1-Rezeptors mit $G\alpha_{q/11}$ oder $G\alpha_{i1,2}$ beschrieben. In wieweit dies für humane β -Zellen Bedeutung hat ist nicht bekannt [Montrose-Rafizadeh et al., 1999].

Letztlich kommt es durch die Bindung von GLP-1 zu eine Erhöhung der Konzentration des freien zytosolischen Calciums, was eine Exozytose der Insulin-granula ausgelöst wird [Yada et al., 1993; Lu et al., 1993]. Viele der weiteren Schritte der Signaltransduktion, dass heißt der Weg, auf dem das Signal in der Zelle bis zum endgültigen Effekt weitergeleitet wird, sind noch nicht aufgeklärt. Da die Signaltransduktion zur Insulinfreisetzung und die Beteiligung von Proteinkinasen zentrale Punkte dieser Arbeit sind, wird diese Thema gesonderten unter Kapitel 1.9 behandelt.

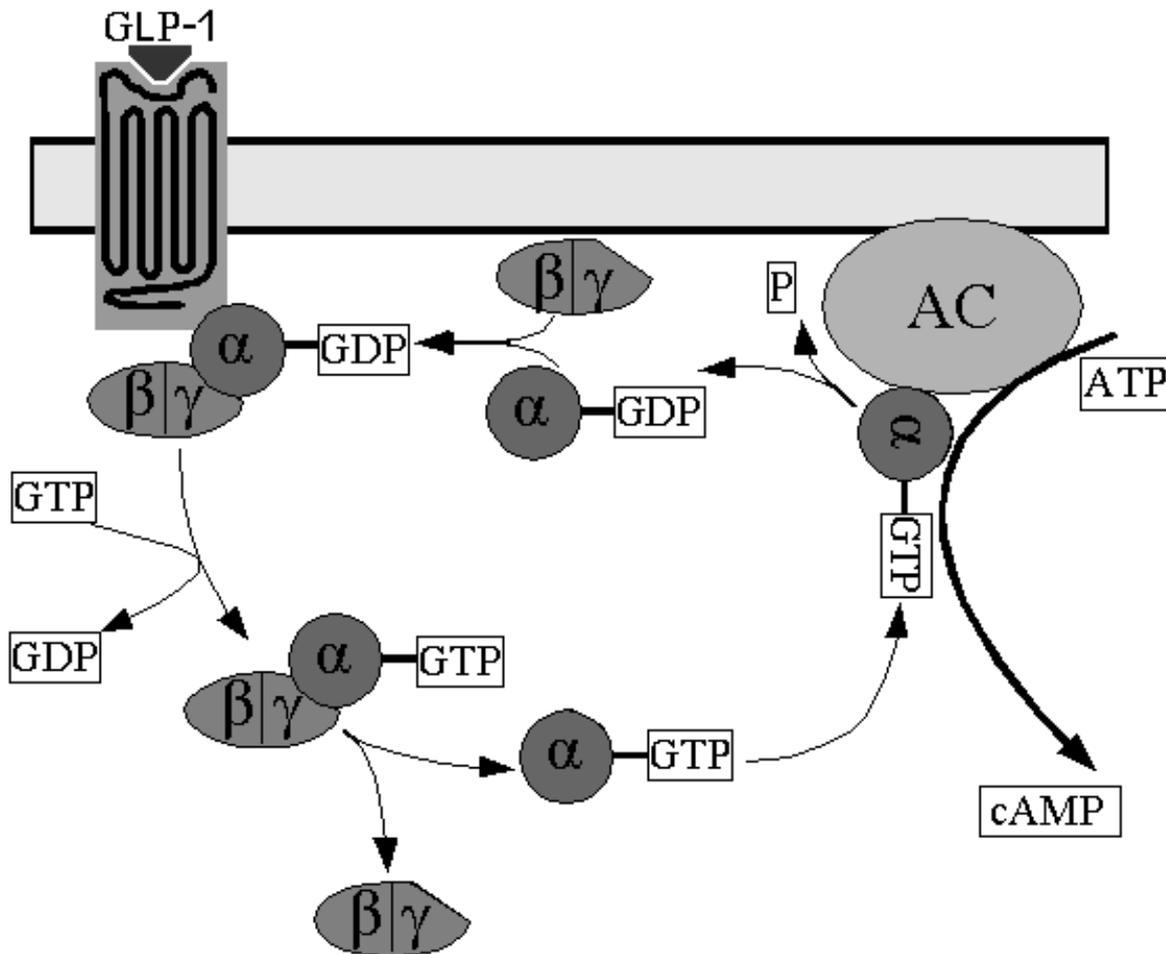


Abbildung 1.5: Der GLP-1-Rezeptor, erste Schritte der Signaltransduktion

Der GLP-1 Rezeptor ist an ein G-Protein gekoppelt, der bei Rezeptoraktivierung das Signal an die Adenylatzyklase vermittelt, so dass cAMP gebildet werden kann.

Nach seiner Aktivierung durch GLP-1 oder andere Agonisten wird der GLP-1-Rezeptor in die Zelle aufgenommen, internalisiert, und im Verlauf wieder an die Plasmamembran abgegeben, während der Ligand in Lysosomen abgebaut wird [Widmann et al., 1995]. Durch Einwirkung von GLP-1 kommt es am Rezeptor zu einer homologen Desensibilisierung, so dass eine lange Inkubation mit höheren Konzentrationen GLP-1 den Anstieg der cAMP-Konzentration bei einem erneuten Stimulation vermindert [Fehmann et al., 1991a; Thorens et al., 1996a].

Neben den β -Zellen des Pankreas konnte der GLP-1-Rezeptor auch in anderen Geweben gefunden werden. So konnte der GLP-1-Rezeptor innerhalb des endokrinen Pankreas ebenfalls auf Somatostatin-produzierenden δ -Zellen nachgewiesen werden [Fehmann et al., 1991b]. Das Vorkommen von GLP-1-Rezeptoren auf den α -Zellen des

Pankreas wird kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen konnten auf der Glukagon-produzierende α -Zelllinie INR1G9 und α -Zellen der Ratte keine Rezeptoren für GLP-1 bzw. ihre DNA finden [Fehmann et al., 1991b; Moens et al., 1996]. Andere Versuche konnten die Existenz von GLP-1-Rezeptoren auf 20% der Glukagon-produzierenden α -Zellen des endokrinen Pankreas der Ratte belegen und die Expression ihrer mRNA in diesen Zellen nachweisen [Heller et al., 1997].

Der GLP-1-Rezeptor kommt aber auch außerhalb des endokrinen Pankreas vor. So gibt es Belege für seine Existenz auf Magendrüsen und Fettzellen der Ratte [Uttenthal et al., 1990; Valverde et al., 1993]. Beim Menschen konnte die mRNA des GLP-1-Rezeptor im Magen, in der Niere, im Gehirn sowie im Herzmuskelgewebe aufgezeigt werden [Wei et al., 1995]. In der Lunge finden sich GLP-1-Rezeptoren bei der Ratte in der Plasmamembran des Lungengewebes und beim Menschen auf mukösen Drüsen der Trachea und in der glatten Muskulatur der Lungenarterien [Richter et al., 1990; Richter et al., 1993]. Entsprechend dem Vorkommen von GLP-1-Rezeptoren in den verschiedensten Gewebearten ist auch die Wirkung von GLP-1 vielfältig, wie es im nächsten Kapitel aufgeführt wird.

1.5 Metabolismus und Wirkung von GLP-1

Stärkster Stimulus für die GLP-1-Freisetzung ist die orale Zufuhr von Glukose, wobei der Plasmaspiegel schnell auf das 6-8fache des Basalwertes ansteigt. Bei flüssigen Nährstoffen kann der Anstieg schon binnen 5 Minuten erfolgen. Nach 90 Minuten werden wieder basale Werte erreicht. Auch orale Galaktose und Aminosäuren bewirken eine GLP-1-Sekretion. Währenddessen setzt intravenöse Glukosezufuhr keine GLP-1 frei [Herrmann et al., 1995; Elliot et al., 1993]. Die genauen Mechanismen, die zur Sekretion führen, sind noch nicht bekannt. Die L-Zellen, die das GLP-1 bilden, kommen im distalen Dünndarmabschnitt und im Kolon vor, wobei ihre Anzahl vom Duodenum zum distalen Jejunum und vom proximalen zum distalen Kolon zunimmt, so dass sich ihre höchste Dichte im Rektum befindet [Eissele et al., 1992]. Nährstoffe erreichen aber nur selten und dann später das Ileum. Daher wird angenommen, dass die GLP-1-Freisetzung durch verschiedene Mechanismen wie humorale Mediatoren oder das autonome Nervensystem reguliert wird, vielleicht sogar durch eine neuroendokrine

Schleife zwischen dem oberen und unteren Abschnitt des Gastrointestinaltraktes [Roberge et al., 1993].

Das freigesetzte GLP-1 hat im Serum des Menschen eine sehr kurze Halbwertszeit. Für GLP-1(7-36)amid wurde eine Plasmahalbwertszeit von ca. 5,3 Minuten, für GLP-1(7-37) von ca. 6,1 Minuten ermittelt [Orskov et al., 1993]. In vitro in humanem Plasma schien die Amidierung des C-terminalen Endes eine etwas länger Überlebenszeit im Plasma zu bewirken [Wettergren et al., 1998].

Die Spaltung durch die Aminopeptidase Dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV) scheint für den GLP-1-Abbau der wichtigste Abbauschritt zu sein. Die DPP IV trennt am N-terminalen Ende die ersten beiden Aminosäuren (Histidin und Alanin) ab. Das so entstandene GLP-1(9-37) bzw GLP-1(9-36)amid ist biologisch inaktiv [Mentlein et al., 1993]. Als einen andere Eliminationsweg aus dem Plasma ist die die Internalisation von GLP-1 mit seinem Rezeptor in die Zelle beschrieben [Widmann et al., 1995] Ebenso wird der renalen Ausscheidung eine signifikant Rolle zugeschrieben [Ruiz-Grande et al., 1990; Meier et al., 2004]. Des weiteren erfolgt ein Abbau von GLP-1 durch die neutrale Endopeptidase 24.11 [Hupe-Sodemann et al., 1997].

Als Inkretin ist der Hauptwirkungsort des freigesetzten GLP-1 das endokrine Pankreas. GLP-1 stimuliert dosisabhängig die Insulinsekretion der β -Zellen der Langerhansschen Inseln in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration. Bei einer Glukosekonzentration von 2,8mM konnte dementsprechend kein GLP-1-Effekt nachgewiesen werden, während bei 5mM oder 10mM die Insulinsekretion stimuliert wird [Holst et al., 1987; Göke et al., 1993, Fehmann et al., 1995b]. Bei kontinuierlicher Infusion von GLP-1 in supraphysiologischen Konzentrationen wurde eine Glukosespiegel von 3,3mM nie unterschritten [Orskov et al., 1993], so dass keine Hypoglykämie zu erwarten ist. Auch bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 können durch GLP-1 normale Blutglukosewerte erreicht werden [Gutniak et al., 1993].

GLP-1 führt zu einer schnelleren Insulinantwort auf Glukose. So ist bei Wistar-Ratten gezeigt worden, dass der Glukose-induzierte Insulinpeak im Plasma von 30min auf 15min nach Glukoseinjektion verschoben wurde [Wang et al., 1997]. Zusätzlich bewirkt GLP-1 eine verstärkte Transkription des Proinsulin-Gens in der β -Zellen und regt die Proinsulin- und Insulinbildung an [Drucker et al., 1987; Fehmann et al., 1992;

Wang et al., 1997].

An den δ -Zellen des Pankreas führt GLP-1 zu einer erhöhten Somatostatinsekretion. Diese scheint jedoch unabhängig von der Glukosekonzentration zu sein [Fehmann et al., 1995b; Heller et al., 1995]. In Hinblick auf die α -Zellen kommt es durch GLP-1 zu einer Senkung des Glukagonspiegels bzw. einer Hemmung der Glukagonsekretion, was beim Typ I Diabetiker zur Erniedrigung des Nüchternblutzuckerspiegels führt [Creutzfeld et al., 1996; Komatsu et al., 1989; Todd et al., 1998]. Dieser Effekt könnte durch eine parakrine Wirkung innerhalb der Langerhansschen Insel zustande kommen [Fehmann et al., 1995b, Komatsu et al., 1989], zumal in der Literatur die Existenz eines GLP-1-Rezeptors auf α -Zellen kontrovers diskutiert wird (siehe Kapitel 1.4). Das durch GLP-1 verstärkt ausgeschüttete Insulin oder Somatostatin könnte zu einer Hemmung der Glukagonsekretion führen [Fehman et al., 1991b].

Nachdem, wie in Kapitel 1.4 erwähnt, GLP-1-Rezeptoren in den verschiedensten Geweben nachweisbar sind, konnten auch andere, extrapancreatische Wirkungen von GLP-1 aufgezeigt werden (siehe Abbildung 1.6).

Am Magen hemmt GLP-1 zum Beispiel die Pentagastrin-induzierte Säurebildung und verlangsamt die Magenentleerung. Dadurch verzögert sich die postprandiale Trypsin- und Lipasesekretion, so dass der Blutzuckerspiegel nach Nahrungsaufnahme langsamer und nicht so stark steigt [Nauck et al., 1997; Schjoldager et al., 1989; Wettergren et al., 1993]. Der Glukosemetabolismus der Peripherie soll ebenfalls von GLP-1 beeinflusst werden. In den Fettzellen der Ratte und Muskelzellen der Ratte sowie des Menschen erhöht es die durch Insulin stimulierte Glykogensynthese, die Glukoseoxidation und Verarbeitung sowie die Lipogenese. Die Plasmakonzentration von ungebundenen Fettsäuren kann durch GLP-1 deutlich erniedrigt werden [Orskov et al., 1993; Perea et al., 1997; Sandhu et al., 1999; Luque et al., 2002; Acitores et al., 2004; Villanueva-Penacarrillo et al., 1994].

Nach dem Nachweis von GLP-1-Rezeptoren im Hypothalamus, der Amygdala und dem anterodorsalen Thalamus konnte für GLP-1 auch eine Bedeutung bei der zentralen Steuerung der Nahrungsaufnahme gezeigt werden [Turton et al., 1996]. Eine intrazerebroventrikulärer Injektion von GLP-1 führt zu einer starken Hemmung der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme der Ratten [Tang-Christensen et al., 1996; Turton et al., 1996]. Auch beim Menschen konnte diese Wirkung von GLP-1 bestätigt werden.

So reduzierte intravenös verabreichtes GLP-1 in der zentralen Phase der Nahrungsaufnahme die Essmenge und das Hungergefühl [Gutzwill et al., 1999].

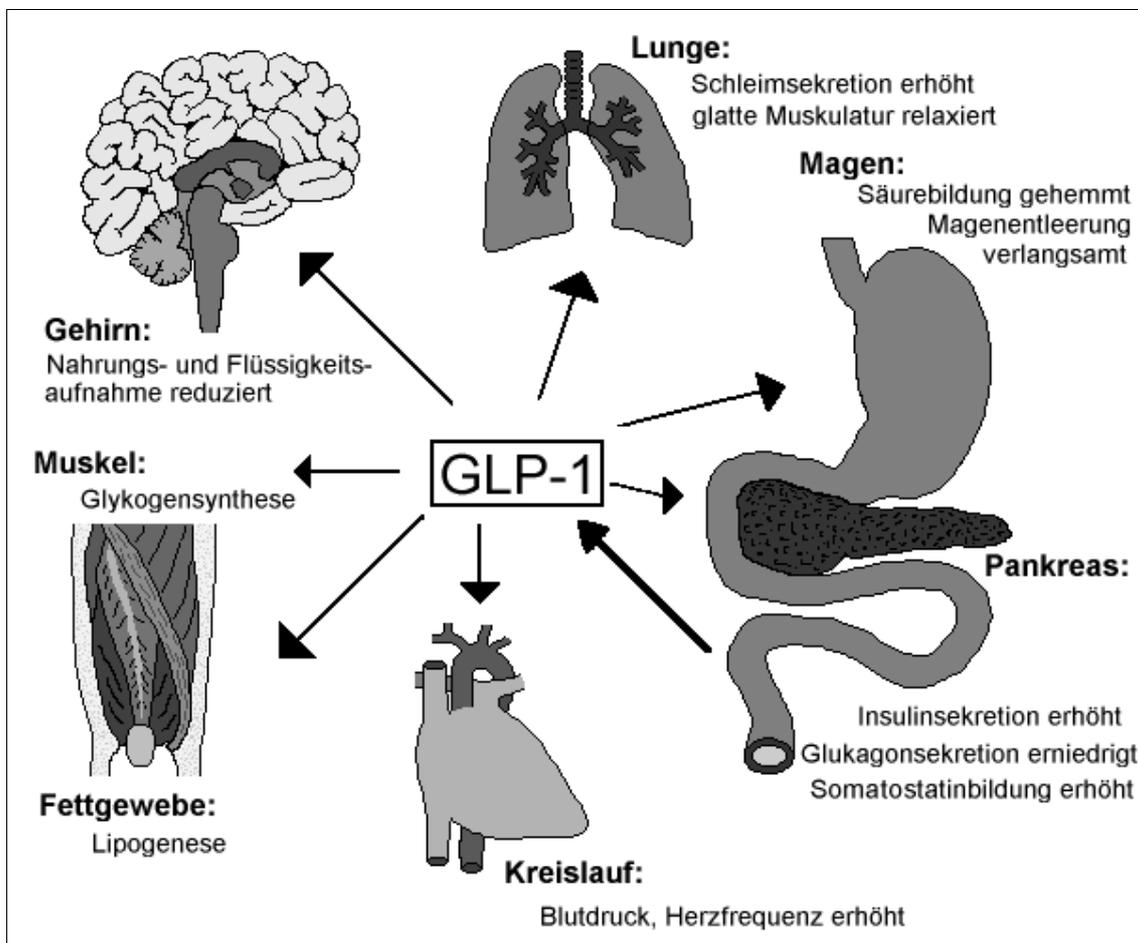


Abbildung 1.6: Verschiedene Wirkungen von GLP-1

Diese bisher aufgeführten Effekte von GLP-1 haben im Endeffekt immer Einfluss auf die Glukosehomöostase. Es wurden aber auch davon scheinbar unabhängig Wirkungen beschrieben. Die GLP-1-Rezeptoren im Lungengewebe der Ratte bewirken bei GLP-1-Gabe eine Steigerung der Schleimsekretion und der Relaxation der glatten Muskulatur [Richter et al., 1990 und 1993]. Intravenöse GLP-1 erhöht bei Ratten unabhängig von Katecholaminen den Blutdruck und die Herzfrequenz [Barragán et al., 1994].

Insgesamt lässt sich erkennen, dass das Wirkspektrum von GLP-1 sehr vielfältig ist, auch was die Möglichkeiten eines therapeutischen Einsatzes angeht.

1.6 GLP-1 und sein therapeutischer Nutzen bei Diabetes mellitus

Über die Pathophysiologie der Inkretin, wie GLP-1 bzw. die Auswirkungen einer gestörten GLP-1-Sekretion ist wenig bekannt. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II findet sich ein reduzierter Inkretineffekt. Es konnte nachgewiesen werden, dass auf orale Glukosegabe der Anstieg der Insulinsekretion vermindert ist, trotz einer unveränderten oder höheren GIP-Antwort. Exogen zugeführtes GIP zeigte bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II keine bzw. eine deutlich reduzierte Wirkung, so dass sich GIP schlecht als Antidiabetikum nutzen lässt [Nauck et al., 1986; Meier et al., 2001]. Bei nicht-diabetischen Menschen mit einer Insulinresistenz wurde eine verminderte GLP-1-Antwort bei Nahrungsaufnahme gefunden. Des weiteren zeigte sich bei adipösen Probanden und Menschen mit Diabetes Typ II eine herabgesetzte GLP-1-Sekretion bei oraler Nahrungsaufnahme, die in Teilen mitverantwortlich für die erniedrigten postprandialen Insulinfreisetzung sein könnte [Rask et al., 2001; Vilsboll et al., 2003, Ranganath et al., 1996; Vaag et al., 1996].

Um die Bedeutung von GLP-1 für die Behandlung des Diabetes mellitus genauer einordnen zu können sollen kurz die beiden Hauptformen dieser Erkrankung beschrieben werden. Unter dem Begriff Diabetes mellitus (Honigsüßer Durchfluss) wird eine heterogene Gruppe von Erkrankungen zusammengefasst, bei denen es durch einen dauerhaften Insulinmangel oder eine periphere Insulinresistenz zur Störung des Kohlenhydratstoffwechsels kommt mit pathologischer Glukosetoleranz, erhöhten Blutglukosekonzentrationen im Nüchternzustand sowie postprandial. An den verschiedenen Formen des Diabetes mellitus sind insgesamt durchschnittlich 5% der Bevölkerung erkrankt (unter 50 Jahre 1%, über 65 Jahre 10%). Der Diabetes mellitus ist somit die wichtigste endokrine Erkrankung unserer Gesellschaft. Er wird vor allem in zwei große Gruppen unterteilt: Beim Insulin-abhängigen Typ I liegt eine fehlende Insulinsynthese infolge einer Zerstörung der β -Zellen der Langerhansschen Inseln vor. Therapeutisch sind diese Patienten auf die Gabe von Insulin angewiesen. Die Entstehung des nicht-Insulin-abhängigen Typ II (non-insulin-dependent diabetes mellitus – NIDDM) ist multifaktoriell und oft mit dem „Metabolischen Syndrom“ verbunden. Dabei kommt es durch Adipositas zu einer peripheren Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie. Langfristig folgt eine unzureichende Insulinsekretion des Pankreas

bei Glukosestimulation [Alberti et al., 1998; Classen et al., 1993]. Bei dieser Form des Diabetes mellitus bestehen verschiedene, jedoch insgesamt nicht ausreichende medikamentöse Therapieansätze. Durch die α -Glukosidase-Hemmung oder Füllstoffe kann zum Beispiel die Kohlenhydratresorption vermindert werden. Biguanide wie Metformin bewirken zur verminderten Glukoseresorption auch eine Hemmung der hepatischen Glukoneogenese und eine verstärkte Glukoseaufnahme in die Muskulatur und sind somit geeignet bei peripherer Insulinresistenz. Biguanide können jedoch bei Niereninsuffizienz, Lungen- oder Lebererkrankungen nur begrenzt eingesetzt werden. Die Sulfonylharnstoffe führen über den Sulfonylharnstoff-Rezeptor am ATP-abhängigen Kaliumkanal zur Zelldepolarisation und Insulinausschüttung unabhängig von der Glukosekonzentration [DeFronzo, 1999; Classen et al., 1993; Aguilar-Bryan et al., 1995]. Der oft schon erhöhte Insulinspiegel wird weiter gesteigert. Infolge einer Erschöpfung der β -Zellen reagieren 11-36 % der Patienten mit NIDDM nach einem Jahr nicht mehr ausreichend auf Sulfonylharnstoffe und müssen mit Insulin behandelt werden [Leibovitz et al., 1978; DeFronzo, 1999]. Ein weiterer, großer Nachteil der bisherigen Therapeutika, vor allem der Sulfonylharnstoffe wie auch Insulin selbst, ist ihre Glukose-unabhängige Wirksamkeit. Sie können so zu lebensbedrohenden Hypoglykämien führen.

Dass sich auch Extrakte aus dem Darm, wie es die Inkretine GLP-1 oder GIP sind, in der Behandlung des Diabetes mellitus einsetzen lassen, wurde schon 1906 von Moore et al. beschrieben. Aus den oben aufgeführten verschiedenen Wirkungen (siehe Kapitel 1.5) lässt sich schließen, dass GLP-1 ideal ist, um die Stoffwechsellage eines Patienten mit Diabetes mellitus auf verschiedenen Ebenen zu verbessern, da es neben der verstärkten Insulinfreisetzung, verminderten Glukagonkonzentration auch die Magenentleerung und somit die Glukosezufuhr verlangsamt und des weiteren das Hungergefühl sowie die Nahrungsaufnahme reduziert [Nauck et al., 1997; Schjoldager et al., 1989; Wettergren et al., 1993; Gutzwill et al., 1999].

So konnte gezeigt werden, dass durch exogen zugeführtes GLP-1, intravenös sowie subkutan, eine deutliche Erniedrigung des Glukosespiegels bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II erzielt werden kann, die nahezu dem Niveau der Kontrollgruppe entspricht und auch nach längerer Behandlungsdauer, hier 3 Wochen, noch anhielt [Nauck et al., 1998; Todd et al., 1998; Rachmann et al., 1997]. Bei Typ-I-Diabetikern

fürte GLP-1 vor allem durch eine Reduktion der Glukagonkonzentration zu niedrigeren Nüchternblutzuckerspiegeln allerdings nicht auf normale Werte [Creutzfeldt et al., 1996]. Insgesamt verringert GLP-1 den postprandialen Insulinbedarf bei beiden Formen des Diabetes mellitus [Gutniak et al., 1992]. Ein weiterer großer Vorteil ist die Glukoseabhängigkeit der GLP-1-Wirkung, die gefährliche Unterzuckerungen verhindert. Selbst bei kontinuierlicher Zufuhr von GLP-1 in supraphysiologischen Konzentrationen wurde eine Glukosespiegel von 3,3mM nie unterschritten [Orskov et al., 1993].

Neben den vielen positiven Eigenschaften gestaltet sich jedoch der praktikable Einsatz von GLP-1 als Antidiabetikum bislang wegen der kurzen Halbwertszeit problematisch. Um diese Schwierigkeit zu verhindern, wird zum einen nach einem Weg gesucht, den GLP-1-Abbau zu reduzieren. Die Hemmung der Aminopeptidase Dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV), dem Hauptabbauschritt von GLP-1, führt entsprechend zu einer verbesserten Glukosetoleranz und Insulinsekretion [Holst et al., 1998; Balkan et al., 1999]. Zum anderen wird nach einem stabileren GLP-1-Analogen mit einer längeren Halbwertszeit geforscht. Neben dem GLP-1-Analogen am Rezeptor könnte auch ein besseres Wissen über die bislang nicht bekannten Schritte der GLP-1-Effekte in der Zelle und somit der Signaltransduktion hilfreich sein, neue Antidiabetika zu entwickeln.

1.7 Bedeutung von Calcium als Second messenger in der Signaltransduktion

Hormone wie GLP-1, die die Zellmembran nicht durchdringen können, müssen ihre intrazelluläre Wirkung durch membranständige Rezeptoren vermitteln. Wie im Kapitel 1.4 beschrieben, kommt es durch die Hormon-Rezeptor-Bindung über bestimmte Reaktionsschritte zwischen Proteinen der Zellmembran zur enzymatischen Freisetzung von zweiten Botenstoffen im Zellinneren, den Second messenger, wie dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP). Meist sind im weiteren noch andere Botenstoffe, Third messenger, an der Signaltransduktion beteiligt. An diesen intrazellulären Pfaden sind neben cAMP oder Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3) auch Calciumionen und Proteinkinasen beteiligt, die unterschiedlichste Effekte wie Zellproliferation, Zelltod oder die Sekretion von Hormonen wie Insulin vermitteln [Pietrobon et al., 1990].

1.7.1 Regulierung der zytosolischen Calciumkonzentration und ihre Bedeutung für die Signaltransduktion

Damit Kationen wie Calcium als Second messenger agieren können, müssen bei Aktivierung kurzfristige und relative zum Ruhezustand signifikante Änderungen in der intrazellulären Kationenkonzentration möglich sein. Die Aufrechterhaltung einer konstant niedrigen Calciumionenkonzentration im Ruhezustand und deren Wiederherstellung nach Ende der Erregung ist eine wichtige Voraussetzung. Dem entsprechend wird die intrazelluläre Calciumionenkonzentration durch Calciumtransport aus der Zelle, in Zellorganellen oder durch Bindung an Plasmaproteine basal bei 10^{-7} mol/l gehalten und ist somit 10.000fach kleiner als die des Extrazellulärraums. Dieser Gradient wird für den Calciumeinstrom bei Aktivierung der Zelle ausgenutzt (siehe Abbildung 1.7) [Carafoli, 1987; Pietrobon et al., 1990].

Zum Aufbau dieses Konzentrationsgefälles und um das Calcium aus der Zelle zu befördern, gibt es in der Plasmamembran zwei unterschiedliche Systeme: Zum einen die Calcium-ATPase, zum anderen den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Die Calcium-ATPasen, die in allen untersuchten eukaryonten Zellen nachgewiesen worden sind, benötigen für den Calciumtransport gegen das Konzentrationsgefälle Energie, die durch Hydrolyse von ATP gewonnen wird. Währenddessen nutzt der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter ohne ATP-Verbrauch indirekt die elektrochemische Energie, die durch die Na^+/K^+ -ATPase aufgebaut wird. Diese Na^+/K^+ -ATPase baut unter Hydrolyse von ATP ein Natriumgefälle auf, wobei die Konzentration von Natrium im extrazellulären Raum 140mmol/l und innerhalb der Zelle 10mmol/l beträgt. Diesen Gradient nutzt jetzt der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter aus und befördert bei repolarisierter Plasmamembran jeweils drei Natriumionen in und ein Calciumion aus der Zelle. Wie oben beschrieben, gibt es zusätzlich die Möglichkeit, das Calcium aus dem Zytoplasma in Zellorganellen, zum Beispiel in das endoplasmatische Retikulum verschiedener Zellen bzw. das sarkoplasmatische Retikulum des Muskels, zu transportieren. Dies geschieht unter anderem wie in der Plasmamembran durch eine Ca^{2+} -ATPase unter ATP-Verbrauch (SERCA – sarko- und endoplasmatisches Retikulum Calciumpumpe). Zudem befinden sich im Zytoplasma Proteine wie Parvalbumin, deren Hauptaufgabe es ist, freie Calciumionen zu puffern [Schatzmann, 1989; Carafoli, 1987; Pietrobon et al., 1990].

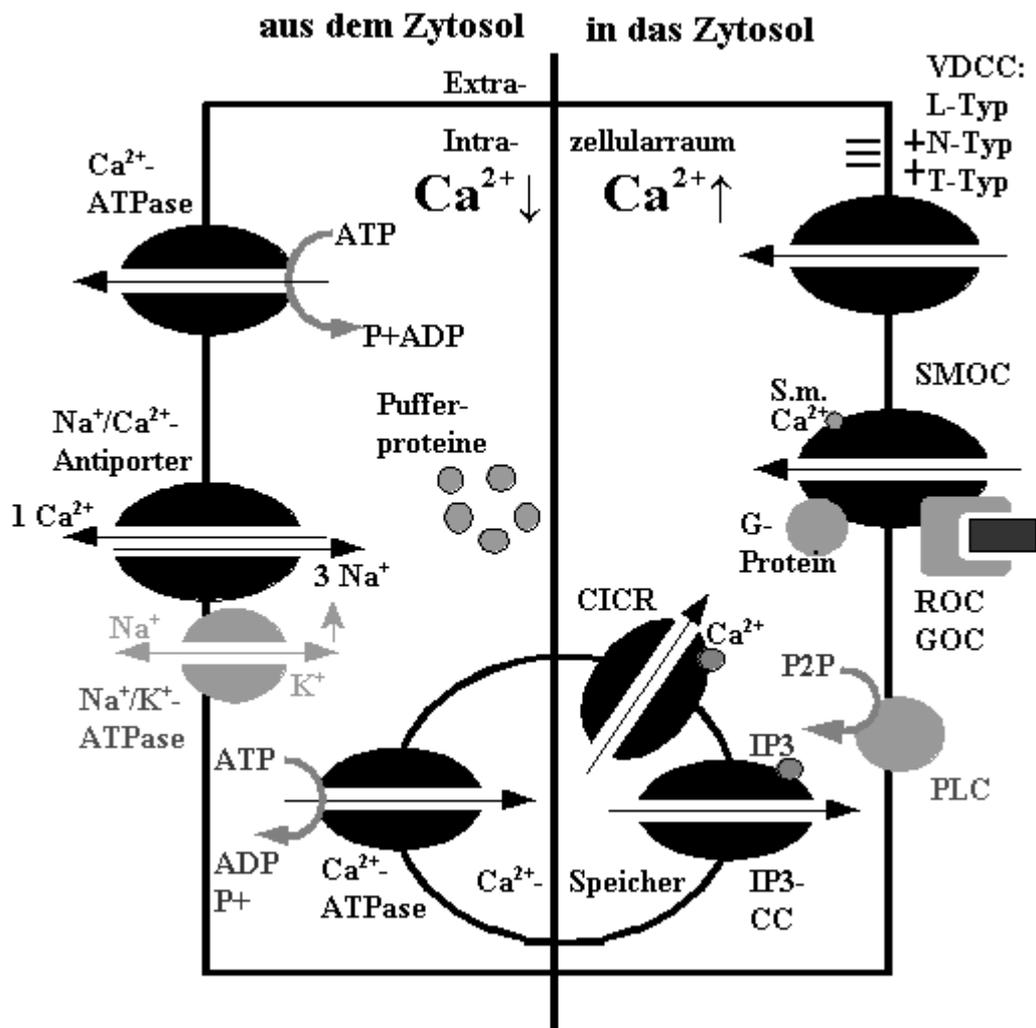


Abbildung 1.7: Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration

Abkürzungen siehe Text. Soweit nicht anders beschriftet, werden entsprechend der Pfeile Calciumionen in Pfeilrichtung transportiert bzw. bewegt.

Für Calcium als Second messenger ist es aber auch wichtig, dass bestimmte Signale in der Zelle zu einer raschen Erhöhung der Calciumkonzentration führen. Dazu befinden sich Calciumkanäle zum einen in der Zellmembran, zum anderen in der Membran der intrazellulären Calciumspeicher. Bei aktivierten, offenen Kanälen folgen die Calciumionen ohne Energieaufwand dem Konzentrationsgefälle in das Zytosol.

Die Calciumkanäle der Plasmamembran werden grob in Spannungs- und Agonisten-abhängige Kanäle unterschieden. Einige Agonisten-abhängigen Calciumkanäle sind direkt an einen Rezeptor gekoppelt und können von außerhalb der Zelle beeinflusst werden (receptor-operated channels – ROC). Andere werden über einen Second messenger oder ein G-Protein reguliert, das sich an der Innenseite der Plasmamembran

befindet (second messenger-operated channels - SMOCs und G-protein-operated channels – GOC) [Pietrobon et al., 1990].

Auch die spannungsabhängigen Calciumkanäle (voltage-operated oder dependent calcium channels - VOC = VDCC) werden nach ihren Eigenschaften in verschiedene Untergruppen unterteilt. Die L-Typ VDCCs kommen in sekretorischen, neuronalen und muskulären Zellen vor. Sie sind wie unter Kapitel 1.1 beschrieben für den Calciumeinstrom bei der Glukose-bedingten Insulinsekretion verantwortlich und besitzen die höchste Leitfähigkeit. Bei Membranpotentialen größer als -30 bis -20mV werden sie aktiviert, wobei ihre Öffnungszeit relative lange andauert. Zudem sind sie durch Dihydropyridine wie Nifedipin hemmbar. Die N-Typ VDCC sind möglicherweise neuronenspezifisch. In Gegensatz zu den beiden vorherigen werden die T-Typ VDCC schon bei einem Membranpotential über -40 bis -30mV aktiviert, sind nur kurz geöffnet und agieren deswegen sehr wahrscheinlich in der Funktion als Schrittmacher [Carafoli, 1987; Pietrobon et al., 1990].

Neben den verschiedenen Calciumkanälen der Plasmamembran kann Calcium auch aus den intrazellulären Speicher ins Zytosol strömen. Ein Teil der Calciumkanäle des endoplasmatischen Retikulums sind IP₃-sensibel (IP₃-CC) und werden aktiviert, wenn ein Agonist an der Plasmamembran die Phospholipase C (PLC) stimuliert und nachfolgend IP₃ als Second messenger ins Zytosol freigesetzt wird. Calcium selbst wirkt ebenfalls als Second messenger über viele Effektoren. Unter anderem gibt es Calciumkanäle in der Membran von Calciumspeichern, die sensibel auf Ryanodin sind und die durch zytosolisches Calcium aktiviert werden, wobei diese Aktivierung den so genannte Calcium-induced Calcium-release (CICR) bewirkt [Pietrobon et al., 1990; Berridge, 1987 und 1993].

Durch diese verschiedenen Mechanismen werden sowohl die niedrige intrazelluläre Calciumionenkonzentration im Ruhezustand als auch die kurzfristige Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels bei Stimulation kontrolliert und somit die Calciumhomöostase gewährleistet. Da Calcium, wie in Kapitel 1.1 und 1.3 erwähnt, sowohl bei der Glukose-bedingten als auch bei der GLP-1-induzierten Insulinsekretion als Second messenger involviert ist, eignet es sich besonders, die Signaltransduktion der GLP-1-Wirkung zu untersuchen.

1.8 Bedeutung von Proteinkinasen für die Signaltransduktion

In der Signaltransduktion eukaryonter Zellen spielt die Phosphorylierung von Proteinen eine wesentliche Rolle für die Vielfältigkeit der Reaktionen. Die Phosphorylierung erfolgt durch Proteinkinasen. Die Proteinkinasen sind eine heterogene Gruppe von Enzymen, die das terminalen Phosphat von ATP auf bestimmte Aminosäuren anderer Proteine bzw. Enzyme übertragen. Dies ist ein reversibler Vorgang, wodurch die Aktivität des Empfängerproteins bzw. Enzyme verändert werden kann. So kann innerhalb der Zelle eine gezielte Regulation gewährleistet werden. Als Teil von Kaskaden sind diese Zielproteine oft selbst Kinasen, die wiederum nachfolgende Proteine phosphorylieren. Die Reversibilität der Phosphorylierung wird durch spezifische Proteinphosphatasen garantiert, die nach Beendigung des Reizes die entsprechenden Phosphate entfernen. So wird Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem Zustand garantiert [Hunter et al., 1995, Taylor, 1989].

Nach der Aminosäure, die das Phosphat erhält, werden die Proteinkinasen in zwei Gruppen unterteilt. Die Serin-Threonin-Kinase phosphorylieren die Zielproteine an den Aminosäuren Serin oder Threonin, während Tyrosinkinasen entsprechend Phosphat an Tyrosin binden [Jones et al., 1998].

Die Serin-Threonin-Kinasen werden wiederum je nach den zur Aktivierung notwendigen Substanzen unterschieden. Von zyklischen Nukleotiden abhängig sind die Proteinkinase A, die cAMP benötigt, und die Proteinkinase G, die durch zyklisches Guanosinmonophosphat, cGMP, aktiviert wird. Die CaM-Kinasen setzen einen Komplex aus Calcium und dem Calcium-bindenden Protein, Calmodulin, voraus. Die Proteinkinase C ist hingegen je nach den regulatorischen Untereinheiten von Diacylglycerol und / oder Calcium abhängig. Eine weiter atypische Form der Proteinkinase C benötigt keines der beiden [Taylor, 1989; Stull, 2001; Newton, 1995 und 2003].

Diese Proteinkinasen bestehen aus einer regulatorischen und einer katalytischen Einheit. Die nicht-katalytische Einheit variiert stark und ist wichtig für die subzelluläre Lokalisation und die Aktivierung. Der katalytische Kern zeigt bei den verschiedenen Kinasen einige Gemeinsamkeiten. Im inaktiven Zustand besteht zum Beispiel die Proteinkinase A aus zwei katalytischen Einheiten und zwei regulatorischen Einheiten,

die wiederum je zwei cAMP binden können. Bei Erhöhung des cAMP-Spiegels führt das Binden von cAMP zu einer Veränderung der Konformation der regulatorischen Einheit, was eine Dissoziation der Untereinheiten ermöglicht. Dadurch werden die katalytischen Einheiten freigesetzt. Über eine Autophosphorylierung werden diese weiter aktiviert, so dass bestimmte Proteine phosphoryliert werden können. Bei der Proteinkinase C wird hingegen eine übergeordnete Kinase zur eigenen Phosphorylierung benötigt [Taylor, 1989; Jones et al., 1998; Newton, 2003].

Die Tyrosinkinasen werden grob in Rezeptor-Tyrosinkinasen und Rezeptor-assoziierte bzw. Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen unterteilt. Dabei sind die Rezeptor-Tyrosinkinasen transmembranös, so dass ein extrazellulärer Liganden direkt bindet und durch Rezeptordimerisation, Konformationsänderungen und Autophosphorylierung zu einer Änderung des zytoplasmatischen Anteils führt. An die jetzt phosphorylierten Anteile bzw. Tyrosine können über src-homologe Regionen, so genannte SH2 / SH3-Domänen, weitere Proteine wie Kinasen, Phosphatase oder Lipasen binden und das Signal in die Zelle weiterleiten. Zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören beispielsweise der EDF-Rezeptor (Epidermal growth factor) oder der Insulinrezeptor. Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinasen sind hingegen intrazelluläre Kinasen, die über SH2-Domänen in der regulatorischen Untereinheit an die Tyrosinphosphat-Gruppe eines anderen, aktivierten Rezeptoren binden und so indirekt aktiviert werden. Eine große Gruppe der Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinasen bildet unter anderem die src-Familie [Malarkey et al., 1995].

Eine weitere eigene Untergruppe von Kinasen bilden die Mitogen-aktivierten Kinasen, MAPK, da zur Aktivierung eine duale Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten notwendig ist. Als MAP-Kinase-Kaskaden leiten sie das Signal in den Nukleus der Zelle weiter und spielen so eine wichtige Rolle für Zellwachstum und -differenzierung [Malarkey et al., 1995; Jones et al., 1998].

In Inselzellen bzw. β -Zelllinien konnten bislang die verschiedensten Proteinkinasen aller oben aufgeführten Familien und die unterschiedlichsten Substrate für Proteinphosphorylierung nachgewiesen werden. Die Bedeutung für die Insulinsekretion wird dabei oftmals kontrovers diskutiert [Ashcroft, 1994; Jones et al., 1998].

Die Proteinkinase A scheint in β -Zellen für die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung keine Bedeutung zu haben. Durch den Glukoseabbau und die nachfolgende

intrazelluläre Calciumerhöhung entsteht durch die Calcium-abhängige Isoform der Adenylatzyklase nur eine kleiner Anstieg der cAMP-Konzentration [Tian et al., 2001; Schuit et al., 1985]. Der Proteinkinase A wird dagegen eine Rolle bei der Modulation bzw. der Potenzierung dieser Glukose-induzierten Insulinfreisetzung durch Hormone wie GIP und GLP-1 zugeschrieben [Jones et al., 1998; Ashcroft, 1994; Gromada et al., 1995; Chijiwa et al., 1990; Yaekura et al., 1996; Holz et al., 1993].

In β -Zellen wurden bislang drei verschiedene Calcium/Calmodulin-abhängige (CaM-) Kinasen nachgewiesen. Glukose-abhängig kommt es zu einem Anstieg der Aktivität der multifunktionalen CaM-Kinase II und zwar in Korrelation und somit als Hinweis auf eine Beteiligung an der Insulinsekretion [Wenham et al., 1994]. Die so genannte „myosin light chain kinase“, die entsprechend die leichte Kette von Myosin phosphoryliert, scheint Anteil an der sekretorischen Phase der Glukose-induzierten Insulinfreisetzung zu haben [Iida et al., 1997]. Wichtiges Substrat der CaM-Kinase III ist der Elongationsfaktor 2, wobei die Rolle von CaM-Kinase III für die Insulinsekretion unklar ist [Jones et al., 1998].

Die Rolle der Proteinkinase C ist wegen der verschiedenen Unterformen schwierig zu beurteilen. Für die Calcium-unabhängigen Proteinkinase C Isoform ϵ konnte eine Assoziation mit den Insulingranula und eine Notwendigkeit für die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung nachgewiesen werden [Mendez et al., 2003]. Weiterhin wird eine Potenzierung der Insulinsekretion über verschiedene Hormone unter Aktivierung des G_q -Proteins, der Phospholipase C und der Bildung von Diacylglycerol erreicht [Jones et al., 1998].

Bislang konnten viele Substrate für Tyrosinkinassen in β -Zellen nachgewiesen werden [Ashcroft et al., 1994; Jones et al., 1998]. Über die Bedeutung der Tyrosinkinassen für die β -Zellaktivität gibt es weniger und zudem differierende Informationen. So ist in der Literatur sowohl eine Reduktion wie eine Steigerung Glukose-induzierten Insulinfreisetzung durch Tyrosinkinase-Hemmstoffe beschrieben worden [Persaud et al., 1993; Konrad et al., 1996; Sorenson et al., 1994; Verspohl et al., 1995]. Insulin selbst vermittelt seine Wirkung über eine Rezeptor-Tyrosinkinase und kann autokrin die Wirkung der β -Zellen beeinflussen. Aktivierung des Insulinrezeptors führt nach Autophosphorylierung zur Tyrosinphosphorylierung der 165-185kDa wiegenden Insulinrezeptorsubstrate IRS 1 / 2, die das Signal in die Zelle weiterleiten [Velloso et al., 1995].

Auch im Zusammenhang mit GLP-1 konnten die Aktivierung von Proteinkinasen bzw. verschiedene durch GLP-1 phosphorylierte Substrate aufgezeigt werden. In Anwesenheit von Glukose konnte an der Insulinomzelllinie RIN 1046-38 eine Tyrosinphosphorylierung von mindestens vier verschiedenen Proteinen durch GLP-1 nachgewiesen werden. Von den Proteinen mit einem Molekulargewicht von 18, 25, 35 und 46kDa wurde dabei das 25kDa-Protein als SNAP-25 identifiziert, welches möglicherweise an der Exozytose beteiligten ist [Zhou et al., 1997]. An der Glukose-unsensiblen Zelllinie RINm5F führten GLP-1 und Forskolin, und somit laut Autoren über Aktivierung der Proteinkinase A, zu einer erhöhte Phosphorylierung von zwei Proteinen mit einem Molekulargewicht von 18,5kDa und 23kDa. Die genaue Identifikation und Funktion dieser Proteine ist noch nicht bekannt [Göke et al., 1996]. An der selben Zelllinie konnte gezeigt werden, dass GLP-1 über das Adenylatzyklase-System und Proteinkinase A den Glukosetransporter GLUT2 phosphoryliert, was eine Erniedrigung der Glukosetransportrate zur Folge hat. Die Auswirkung auf die Insulinsekretion selbst ist jedoch unbekannt [Thorens et al., 1996b].

Wie unter Kapitel 1.1 beschrieben erfolgt die Insulinsekretion in zwei Phasen. Einer schnellen Exozytose der bereitstehenden Granula und eine zweite Phase, bei der die Granula zunächst ATP-abhängig vorbereitet werden müssen [Rorsman, 1997; Gromada et al., 1998a; Henquin et al., 2002]. Die Proteinkinase A scheint einen deutlichen Einfluss auf die zweite Phase der Insulinsekretion zu haben. So konnten in verschiedenen Studien in beide Phasen die Exozytose durch cAMP-Erhöpfung mit GLP-1 und Forskolin gesteigert werden. Durch unterschiedliche Proteinkinase A-Hemmstoffe (10 μ M und 500 μ M Rp-cAMPs, 1 μ M PKI (einem synthetischen Peptid spezifisch für die regulatorische Untereinheit von Proteinkinase A) ließ sich jedoch nur die spätere Insulinfreisetzung vollständig blockieren. [Renström et al., 1997; Eliasson et al., 2003].

Proteinkinasen werden somit auch in β -Zellen eine große Rolle in der Regulierung der Zelle, der Signaltransduktion der verschiedensten Signale sowie der Modulation der Insulinsekretion zugeschrieben. Die genaue Relevanz von Proteinkinasen, insbesondere der Proteinkinase A sowie der Tyrosinkinasen, bei der Signaltransduktion von GLP-1 ist weiterhin noch nicht bekannt und Stand der Forschung.

1.9 Signaltransduktion des GLP-1: Stand der Forschung

Wie unter Kapitel 1.4 beschrieben, ist inzwischen bekannt, dass das freigesetzte GLP-1 seine Wirkung über einen spezifischen GLP-1-Rezeptor vermittelt [Göke R. et al., 1988, Wheeler et al., 1993]. Bei Rezeptorbindung bewirkt GLP-1 intrazellulär über das $G\alpha_s$ -Protein die Aktivierung des Adenylatzyklase-Systems, was wiederum zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels im Zellinneren führt [Göke R. et al., 1989, Serge et al., 1993, Drucker et al., 1987]. cAMP vermittelt oftmals seine Wirkung über die Proteinkinase A, so dass eine Beteiligung dieser Kinase an der Signaltransduktion von GLP-1 vermutet wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch GLP-1 verschiedene Proteine an Tyrosin phosphoryliert werden, so dass Tyrosinkinasen ebenso in die Vermittlung der GLP-1-Wirkung eingebunden sein könnte [Zhou et al., 1997].

In Kontrast zu den guten Kenntnissen über den GLP-1-Rezeptor sind die meisten der weiteren Schritte der Signaltransduktion unbekannt oder sogar Gegenstand kontroverser Diskussionen.

Die Glukose- bzw. Nährstoff-induzierte Insulinfreisetzung wird durch den Schluss der ATP-sensitiven K^+ -Kanälen (K^+_{ATP} -Kanal) ausgelöst, was eine Depolarisation der Plasmamembran, das Öffnen von L-Typ spannungsabhängigen Calciumkanälen (VDCC) mit einem Calciumeinstrom in die Zelle und die Exozytose der Insulingranula zur Folge hat [Ashcroft et al., 1989; Rorsman, 1997]. Das Inkretin GLP-1 bzw. eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels potenziert Glukose-abhängig die Insulinsekretion [Holst et al., 1987; Göke et al., 1993, Fehmann et al., 1995b] und führt zu einer Depolarisation bzw. verstärkten elektrischen Aktivität [Henquin et al., 1984], so dass cAMP eine Veränderung der Aktivität dieser Ionenkanäle, wie dem K^+_{ATP} -Kanal, vermitteln könnte.

In einer Arbeit an aus Ratten präparierten β -Zellen wurde beschrieben, dass GLP-1 synergistisch mit Glukose zu einer Depolarisation der β -Zelle führt und zwar durch eine verstärktes Schließen der K^+_{ATP} -Kanäle. Da sich dieser Effekt durch den Proteinkinase A-Hemmstoff Rp-cAMPs (10 μ M) hemmen ließ, wurde daraus geschlossen, dass GLP-1 Proteinkinase A-abhängig den K^+_{ATP} -Kanal beeinflusst [Holz et al., 1993]. In der Tat besitzen die Untereinheiten (SUR1 und KIR6.2) des K^+_{ATP} -Kanal mögliche

Ansatzstellen für eine Phosphorylierung durch Proteinkinase A [Aguilar-Bryan, 1995; Béguin et al., 1999]. Allerdings wurde bei dem Versuch β -Zellen mit geringer Glukosesensitivität verwendet, die auf 10mM Glukose allein nicht reagierten, so dass sie schlecht mit normalen β -Zellen zu vergleichen sind. Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte an INS-1 Zellen, dass H-89 (1 μ M mit 5-minütiger Inkubation), einen anderen selektiven Proteinkinase-A-Hemmstoff, eine Hemmung der GLP-1-induzierten Abnahme des Kaliumstroms und der Depolarisation bewirkt [Light et al., 2002]. Dieser Effekt auf die GLP-1-induzierten Abnahme des Kaliumstroms und der Depolarisation wurde allerdings bei substimulativer Glukosekonzentration von 5mM erzielt. Die aufgeführten Studien haben den Nachteil, dass zur mangelnden Glukosesensitivität bzw. Glukosekonzentration jeweils nur ein Proteinkinase A-Hemmstoff verwendet wurde.

Andere Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. So ließ sich die GLP-1-bedingte Depolarisation an β -Zellen der Ratte durch Rp-cAMPs nicht beeinflussen [Suga et al., 2000]. Auch eine direkte Beeinflussung des K^+ _{ATP}-Kanals über das G-Protein, wie es für Glukagon nachgewiesen werden konnte, wird als Mechanismus diskutiert [Ribalet et al., 1994]. Weiterhin wird generell die Beteiligung des K^+ _{ATP}-Kanal an der Signaltransduktion von GLP-1 infrage gestellt, da an β -Zellen der Maus gar keine Veränderung des Kaliumstroms bzw. des K^+ _{ATP}-Kanals durch GLP-1 gefunden wurde [Britsch et al., 1994]. Bei den Versuchen reagierten die β -Zellen jedoch nur mit einer leichten Erhöhung der elektrischen Aktivität trotz ausreichender Glukosekonzentration. Henquin et al. berichteten hingegen anhand von Studien mit Forskolin schon 1984, dass cAMP bei Langerhansschen Inseln der Maus zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Depolarisation und einem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels führte, ohne eine Hemmung des Kaliumstroms zu bewirken [Henquin et al., 1984].

Neben dem K^+ _{ATP}-Kanal wurde daher ein nicht selektiver Kationenkanal (NSCC) im Zusammenhang mit der Signaltransduktion von GLP-1 erwähnt, der die Depolarisation der β -Zelle vermitteln soll. Einige Typen von Ionenkanälen können durch die Bindung von cAMP direkt ohne Phosphorylierung durch Proteinkinase A moduliert werden [Finn et al., 1996]. In einer Studie an den Glukose-sensiblen Insulinomzelllinien, β TC6 und HIT-T15, aber auch β -Zellen der Ratten, wurde ein durch GLP-1 aktivierter Ioneneinwärtsstrom gefunden mit Eigenschaften, die typisch für einen nicht selektiven

Kationenkanal sind. Da durch 200 μ M Rp-cAMPs, welches über eine Blockierung der cAMP-Bindungsstelle wirkt [Parker-Botelho et al., 1988], die GLP-1 Wirkung nachgeahmt wurde, gingen die Autoren davon aus, dass es sich um eine Modulation durch cAMP an einer unspezifischeren Bindungsstelle am NSCC und nicht um eine Phosphorylierung durch Proteinkinase A handelt [Holz et al., 1995]. Weiterhin wurde solch ein nicht selektiver Kationenkanal an der seltener benutzten Insulinomzelllinie CRI-GI beschrieben, der direkt durch cAMP, unabhängig von Proteinkinase A aktiviert wurde [Reale et al., 1994 und 1995]. So wurde angenommen, dass GLP-1 durch cAMP direkt diesen nicht selektiven Kationenkanal öffnet, was durch den folgenden Natriumeinstrom eine Depolarisation und die Aktivierung der L-Typ VDCCs bewirkt [Holz et al., 1995]. Bei diesen Studien wurden jedoch außer Rp-cAMPs keine weiteren, strukturell unterschiedlichen Proteinkinase A-Hemmstoffe untersucht. Auch die Auswirkungen einer Vorbehandlung mit Rp-cAMPs auf die GLP-1-induzierte Steigerung der Calciumkonzentration wurde nicht getestet. So konnte die Bedeutung der Proteinkinase A im Bezug auf diesem NSCC für die Signaltransduktion von GLP-1 nicht endgültig geklärt werden.

An β -Zellen von Hamstern konnte gezeigt werden, dass ein GLP-1 und Glukose-abhängiger Natriumeinstrom durch 10 μ M H-89 nur unvollständig gehemmt werden konnte. 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, ein Proteinkinase A-unabhängiger, Epac-spezifischer cAMP-Agonist erhöhte konzentrationsabhängig den Natriumeinstrom unabhängig von 10 μ M H-89. Die Autoren schlossen so auf einen Proteinkinase A-abhängigen und einen davon unabhängigen Anteil der GLP-1-Signaltransduktion [Miura et al., 2003]. Epac ist ein Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (auch cAMP-regulated guanine exchange Faktor, cAMP-GEF, genannt), der durch cAMP reguliert wird und so den Effekt der cAMP-Erhöhung unabhängig von Proteinkinase A weiter geben könnte [Holz, 2004].

Eine weitere Arbeitsgruppe konnte an der oben erwähnten Zelllinien CRI-GI nachweisen, dass sich bei einem Maitotoxin-sensitiven nicht selektiven Kationenkanal die GLP-1-induzierte Wirkung durch den Tyrosinkinasehemmstoff Genistein blockieren ließ, so dass hier auch eine Tyrosinphosphorylierung durch GLP-1 als möglicher Mechanismus diskutiert wurde [Leech et al., 1997, 1998].

Nicht selektive Kationenkanäle könnten entsprechend der aufgeführten Literatur auf verschiedene Weise durch Proteinkinase A, Epac oder Tyrosinkinasen in die Signaltransduktion von GLP-1 eingebunden sein.

Wie die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung ist auch ihre Potenzierung durch GLP-1 vom Öffnen der L-Typ spannungsabhängigen Calciumkanälen (L-Typ VDCC) und dem dadurch bedingten Calciumeinstrom abhängig. Eine Vorbehandlung mit einem Antagonisten der L-Typ VDCC wie Nimodipin bei HIT-Zellen oder Nitrendipin bei Langerhansschen Inseln der Ratte ebenso wie eine Calcium-freie Umgebung der Zellen durch EDTA verhinderte den GLP-1-induzierten Calciumanstieg vollständig [Lu et al., 1993; Yada et al., 1993]. Da sich dieser cAMP-abhängige Calciumeinstrom durch H-89 hemmen ließ, wurde auf eine Phosphorylierung des L-Typ VDCCs durch Proteinkinase A geschlossen [Yaekura et al., 1996]. Aber auch hier wurde erneut nur ein Proteinkinase A-Antagonist und zudem in sehr hohen Konzentrationen (40 μ M) sowie mit einer langen Inkubationszeit (20 Minuten) verwendet, so dass es zur Bestätigung einer Proteinkinase A-Abhängigkeit weiterer Untersuchungen bedarf.

Die Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration ist, wie aus Kapitel 1.7 ersichtlich, durch verschiedene Kanäle auch aus intrazellulären Speichern möglich. So wird, eine Beteiligung von intrazellulären Speichern bei der Signaltransduktion von GLP-1 in der Literatur erwähnt. An einigen β -Zelllinien (β TC3-Zellen, INS-1-Zellen) scheint sich durch GLP-1 bzw. dem Epac-Analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP die Calcium-abhängige Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum triggert zu lassen [Gromada et al., 1995; Kang et al., 2001]. Die Calciumerhöhung erfolgte über einen Ryanodin-abhängigen Rezeptor und war unabhängig von Proteinkinase A, da 1 μ M bzw. 10 μ M H-89, 10 μ M KT5720 und 300 μ M Rp-8-Br-cAMPs zu keiner Inhibition führte [Kang et al., 2001 und 2003]. Allerdings wird generell der Einfluss von intrazellulären Calciumspeichern für die GLP-1-Wirkung sehr kontrovers diskutiert.

Insgesamt werden somit verschiedene Ionenkanäle der β -Zelle im Zusammenhang mit der Signaltransduktion von GLP-1 vor allem im Bezug auf die intrazelluläre Calciumerhöhung und die Insulinfreisetzung gesehen. Der Einfluss, den Proteinkinasen dabei haben, ist noch nicht geklärt und soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Neben der Insulinfreisetzung ist GLP-1 auch ein potenter Stimulator der Insulingenexpression und führt zu einer erhöhten Transkriptionsrate von Insulin [Drucker et al., 1987; Fehmann et al., 1992]. Die Signaltransduktion dieses GLP-1-Effektes ist ebenfalls komplex und noch nicht vollständig bekannt. Der Insulin-I-Gen-Promotor der Ratten besitzt zumindest ein cAMP-Antwort-Element (cAMP-response element -CRE). So wird cAMP über Aktivierung der Proteinkinase A sowie dem CRE-bindendem Protein CREB eine Rolle zugeschrieben [Philippe et al., 1990]. An einer RIN-Zelllinie konnte durch GLP-1 eine Proteinkinase-A abhängige Hochregulierung des Transkriptionsfaktors PDX-1 und dessen Translokation in den Zellkern nachgewiesen werden [Wang et al., 2001]. Aber auch eine Proteinkinase A-unabhängige Stimulation durch den CREB-ähnlichen Transkriptionsfaktor bZIP wurde beschrieben [Skoglund et al., 2000]. Des Weiteren gibt es in der Literatur Hinweis, dass GLP-1 bei verschiedenen Zelllinien die p38 MAP-Kinase aktiviert und darüber die GLP-1-induzierte Zellproliferation vermittelt [Montrose-Rafizadeh et al., 1999; Buteau et al., 2001].

Neben den direkten Wegen der Signaltransduktion wird ein Cross-talk, das heißt eine Verbindung von verschiedenen Pfaden, erwähnt. So soll das an GLP-1 gekoppelte G-Protein den epidermalen Growth-Faktor-Rezeptor transaktivieren und zwar in Abhängigkeit von der Tyrosinkinase c-src sowie Betacellulin, einem Mitglied der EGF-Familie. Der so aktivierte EGF-Rezeptor führt dann über die PI-3-Kinase unter anderem zur Genexpression, Zellproliferation und Insulinbiosynthese [Buteau et al., 2003].

Aus der oben aufgeführten Literatur ist ersichtlich, dass die Signaltransduktion der verschiedenen Effekte von GLP-1 innerhalb der β -Zelle bei weitem noch nicht geklärt ist und zum Teil sehr kontrovers diskutiert wird.

1.10 Beschreibung hier verwendeten β -Zellmodells

Zentrales Thema dieser Arbeit ist die Frage, in wieweit Proteinkinasen, insbesondere die Proteinkinase A und die Tyrosinkinasen, an der Signaltransduktion von GLP-1 in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln beteiligt sind.

Um eine solche Fragestellung mit ausreichender Relevanz beurteilen zu können, wird zunächst ein geeignetes Zellmodell benötigt, das gut mit den menschlichen β -Zellen

vergleichbar ist. Viele der bisher verwendeten Insulinom- β -Zelllinien, wie die RINm5F Zelllinie, weisen deutliche Unterschiede im Vergleich zu menschlichen β -Zellen auf. So führt bei der RINm5F-Zelllinie eine Steigerung der Glukosekonzentration nicht zur Insulinsekretion. Ebenso bewirkt Forskolin, welches die Adenylatzyklase direkt aktiviert, eine Insulinfreisetzung auch schon bei substimulativen Glukosekonzentrationen [Prentki et al., 1987]. Im Gegensatz ist die hier verwendete, hochdifferenzierte INS-1-Zelllinie Glukose-sensitiv. Die INS-1-Zelllinie wurde aus einem transplantablen Insulinom einer Albino-Ratte entwickelt. Die INS-1 Zellen reagieren wie normale β -Zellen auf Glukose, so dass bei Anstieg der Glukosekonzentration durch Depolarisation und Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration die Insulinsekretion erfolgt. Die Glukoseverwertung liegt mit 73% in dem selben Bereich wie bei humanen β -Zellen (60-80%). INS-1 Zellen besitzen die Fähigkeit, Proinsulin I und II zu sezernieren. Der Gehalt an immunoreaktivem Insulin lag bei $8\mu\text{g}/10^6$ Zellen, entsprechend 20% des Insulingehalts einer β -Zelle nativer Ratten [Asfari et al., 1992; Sekine et al., 1994].

Die INS-1-Zelllinie scheint somit ein geeignetes Modell für β -Zellen zu sein. Ein entscheidendes Merkmal zum Vergleich mit den β -Zellen *in vivo* fehlt jedoch, nämlich die natürliche Umgebung innerhalb der Langerhansschen Insel. Alle Inselzellen sind mit so genannten Gap junctions verbunden und können sich untereinander beeinflussen [Meda et al., 1986]. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die INS-1-Zellen durch ihre Isolierung anders verhalten. Um dies mit zu berücksichtigen, wurden in dieser Arbeit neben den INS-1-Zellen auch Langerhanssche Inseln verwendet, die mit einer Kollagenase-Behandlung aus DBA/2-Mäusen gewonnen wurden. Da die Inseln zu 70-90% aus β -Zellen bestehen, ist davon auszugehen, dass die gemessenen Calciumwerte denen der β -Zellen entsprechen [Valdeolmillos et al., 1993]. Durch die elektrische Verbindung mit Gap junctions werden die selteneren Zellen gleich geschaltet [Meda et al., 1986].

Weiterhin sollte bei der Auswahl erwähnt werden, dass es zum Beispiel zwischen ganzen Inseln der Maus und Ratte erhebliche Unterschiede gibt, die, wenn für den Effekt von GLP-1 entscheidend, dem entsprechend in dieser Arbeit mitberücksichtigt würden. In einer Studie über die Unterschiede zwischen Mäusen und Ratten wurde zum Beispiel beschrieben, dass Kollagenase-isolierte Langerhanssche Inseln der Maus bei Stimulation durch Glukose in Form von Oszillationen des Membranpotentials und der intrazellulären Calciumkonzentration reagieren, während Langerhanssche Inseln der

Ratte nicht in der Lage sind Oszillationen zu erzeugen. β -Zellen von Mausinseln verhalten sich somit ähnlich wie humane β -Zellen [Antunes et al., 2000].

Insgesamt sind die einzelnen INS-1-Zellen gewonnen aus einem Ratteninsulinom und die isolierten ganzen Langerhansschen Inseln der Maus zwei sich gut ergänzende Modelle für β -Zellen.

1.11 Ziel und experimentelle Durchführung der vorliegenden Studie

Die im Kapitel 1.9 beschriebene, kontroverse Diskussion über die Bedeutung von Proteinkinasen in der Signaltransduktion des GLP-1 veranlasst dazu, genau diese Frage erneut zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit ist es, unter Verwendung sowohl eines möglichst idealen β -Zellmodells als auch verschiedener, geeigneter Proteinkinasehemmstoffe die Beteiligung der Proteinkinase A und Tyrosinkinasen, an der Signaltransduktion von GLP-1 im Bezug auf die Insulinfreisetzung aufzuschlüsseln. GLP-1 führt unter stimulierender Glukosekonzentration zu einem deutlichen Anstieg des zytosolischen Calciums, welches für die Insulinfreisetzung erforderlich ist [Yada et al., 1993, Cullinan et al., 1994]. So wurde in dieser Untersuchung die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration unter Einsatz des Calcium-sensiblen Fluoreszenzindikators Fura-2 ausgenutzt, um die Auswirkung der verschiedenen Proteinkinaseantagonisten auf den GLP-1-induzierten Calciumanstieg aufzuzeigen (siehe Kapitel 2.4). Weiterhin wurden Messungen des Membranpotentials mit Bisoxonol durchgeführt (siehe Kapitel 2.6).

Das für dieses Vorhaben benutzte β -Zellmodell wurde unter Kapitel 1.10 ausführlich beschrieben. Es beinhaltet zum einen Langerhanssche Inseln aus Mauspräparationen, die einzeln mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet wurden, und zum anderen die gut differenzierte, Glukose-sensible β -Zelllinie INS-1, deren intrazelluläre Calciumkonzentrationen und deren Membranpotential fluorimetrisch in einer Zellsuspension durch Küvettenmessungen dargestellt wurde. Einzelne vollständige Langerhanssche Inseln scheinen nützlich zu sein, um das Verhalten der β -Zellen in einer natürlichen Umgebung zu untersuchen und um das Risiko von präparationsbedingten Artefakten, einem Problem bei einzelnen, zerstreuten β -Zellen, reduziert wird. Auf der anderen Seite könnten die β -Zellen durch die benachbarten endokrinen Zellen auf nicht

kontrollierbare Weise beeinflusst werden, so dass zusätzlich die reine β -Zelllinie INS-1 untersucht wurde.

Zur Beurteilung, welche Proteinkinasen an der Signaltransduktion von GLP-1 beteiligt sind, wurden jeweils an beiden β -Zellarten verschiedenen Proteinkinasehemmstoffe untersucht. Nachdem in der bisherigen Literatur die oftmals einzeln eingesetzten Hemmstoffe nicht zu einer ausreichenden Klärung dieser Fragestellung geführt hatten, wurden hier mit Rp-cAMPs, H-89 und KT 5720 drei verschiedene selektive Antagonisten der Proteinkinase A verwendet. Daneben, zur Abklärung einer Tyrosinkinase-Beteiligung, kamen die zwei häufig benutzten Antagonisten Genistein und Herbimycin A zum Einsatz. Weiterhin wurde der unspezifische, aber sehr potente Proteinkinasehemmstoff Staurosporin untersucht. Um Artefakte dieser Antagonisten am GLP-1-Rezeptor selbst mit zu berücksichtigen, wurde Forskolin eingesetzt, welches direkt die Adenylatzyklase aktiviert und so wie GLP-1 ein Anstieg der cAMP-Konzentration bewirkt. Die Eigenschaften der einzelnen Substanzen sind unter dem Kapitel 2.9 genauer aufgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Geräte

2.1.1 Zellkultur der INS-1-Zellen

1. Wachstumsmedium

RPMI 1640 Medium (Glukosegehalt 11mM)

10 Vol.% fötales Kälberserum

100U Penicillin/ml

100µg Streptomycin/ml

50µM Mercaptoethanol

1mM Natriumpyruvat

10mM HEPES

mit NaOH auf einen pH von 7,4 eingestellt

2. Reagenzien zum Ablösen der INS-1-Zellen von den Kulturplatten

50Vol. % Trypsin / EDTA (Solution X)

EDTA/Trypsin (0,27mM/0,025%)

2.1.2 Präparation der Langerhansschen Inseln

1. Organfärbung

231mg/l Neutralrot in 0,9%iger NaCl

2. Organverdauung

Kollagenase (Clostridium histolyticum) 0,78 PZ U/mg

gelöst in Waschlösung

3. Waschlösung

HBSS (Hank´s balanced salt solution)

20mM HEPES

10mM Glukose

1Vol. % fötales Kälberserum

100U Penicillin/ml

100µg Streptomycin/ml

mit NaOH auf einen pH von 7,4 eingestellt

2.1.3 Zellkultur der Langerhansschen Inseln

1. Wachstumsmedium

RPMI 1640 (Glukosegehalt 11mM)
10Vol. % fötales Kälberserum
100U Penicillin/ml
100µg Streptomycin/ml
mit NaOH auf einen pH von 7,4 eingestellt

2. Lamininbeschichtung der Deckgläser

Laminin (Stammlösung 1mg/ml 1:20 in PBS)

2.1.4 Fluoreszenzindikatoren

1. Fura-2-acetoxymethylester (Stammlösung 5mmol/l in DMSO)
2. Bisoxonol (Stammlösung 100mmol/l in DMSO)

2.1.5 Pufferlösungen

1. Spinner-Medium für INS-1-Zellen

RPMI-Medium (Glukosegehalt 11mM)
25mM HEPES
1Vol.% fötales Kälberserum
100U Penicillin/ml
100µg Streptomycin/ml
1mM Natriumpyruvat

2. modifizierten Krebs-Rieger-Inkubationspuffer für die INS-1-Zellen

136mM NaCl
4,8mM KCl
1,2mM MgSO₄ * 7H₂O
1,2mM KH₂PO₄ * H₂O
5mM NaHCO₃
25mM HEPES
mit NaOH auf einen pH von 7,4 eingestellt

3. Superfusions-Standardpuffer für die Langerhansschen Inseln

120mM NaCl

4,7mM KCl

2,5mM CaCl₂

1,2mM MgCl₂ * 6H₂O

5mM NaHCO₃ * 2H₂O

20mM HEPES

mit NaOH auf einen pH von 7,6 eingestellt (7,4 bei 37°)

2.1.6 Reagenzien zur Kalibrierung der Messungen der INS-1-Zellen

- | | |
|--------------------------|------------------------|
| 1. Triton X-100 | (Stammlösung 10Vol. %) |
| 2. EGTA | (Stammlösung 500mM) |
| 3. Tris | (Stammlösung 3M) |
| 4. KCl | (Stammlösung 2M) |
| 5. Mn(II)Cl ₂ | (Stammlösung 25mM) |
| 6. DTPA | (Stammlösung 50mM) |

Jeweils gelöst in aqua bidestillata (bidest.).

2.1.7 Reagenzien zur Kalibrierung der Messungen der Langerhansschen Inseln

1. hoher Calcium-Standard
 - 100mM KCl
 - 20mM HEPES
 - 1mM CaCl₂
 - 20µM Fura-2-Salz
2. niedriger Calcium-Standard
 - 100mM KCl
 - 20mM HEPES
 - 1mM Na-EDTA
 - 20µM Fura-2-Salz

2.1.8 Messreagenzien

1. GLP-1 (Stammlösung 10^{-5} M in modifizierten Krebs-Ringer-Inkubationspuffer)
2. Forskolin (Stammlösung 5mM in DMSO)
3. Rp-cAMPs (Stammlösung 10mM in Superfusions-Standardpuffer)
4. Sp-cAMPs (Stammlösung 10mM in Superfusions-Standardpuffer)
5. KT5270 (Stammlösung 10mM in DMSO)
6. H-89 (Stammlösung 20mM in DMSO)
7. Genistein (Stammlösung 200mM in DMSO)
8. Daidzein (Stammlösung 200mM in DMSO)
9. Herbimycin (Stammlösung 10mM in DMSO)
10. Staurosporin (Stammlösung 1mM in DMSO)
11. Sulfinpyrazon (Stammlösung 50mM in aqua bidest.)
12. D(+)-Glukose (Stammlösung 1M in aqua bidest.)
13. EGTA (Stammlösung 500mM in aqua bidest.; mit NaOH auf den pH 7,4 eingestellt)
14. KCl-Lösung (Stammlösung 1M in aqua bidest)

2.1.9 Geräte für die Zellkultur von INS-1-Zellen und Inselzellen

1. Zellkulturbrutschrank Heraeus B 5061 EK / CO₂, Heraeus Instrumente, Osterode (Gaskonzentration 5%CO₂)
2. Arbeitsbank Heraeus Laminar Air HLB 2448, Heraeus Instrumente, Osterode
3. Mikroskop Wilovert Binokular, Hund, Wetzlar
4. Schüttelwasserbad, Köttermann, Uetze-Hänigsen

2.1.10 Zentrifugen

1. Superspeed RC-B, Sorvall mit SS-34 und GSA Rotor, Kontron AG, München-Eching
2. L 7-55 Ultrazentrifuge mit 50.2 Ti und SW-28 Rotor, Beckman, München
3. GPKR mit GH-3.7 Roter, Beckmann, München
4. Biofuge A, Heraeus Christ, Heraeus Instrumente, Osterode

2.1.11 Fluoreszenzspektrometer

1. Luminescence Spectrometer LS 50 B, Perkin-Elmer GmbH, Langen
mit IBM Personal System/2 Computer und computergesteuerter Vierfach-Küvettenwechsler mit Magnetrührwerk
2. SFM 25, Kontron AG, München-Eching
mit Wasserbad von Haake L; Haake/Fisons, Karlsruhe

2.1.12 Fluoreszenzmikroskop

1. Zeiss Axiovert 135 TV Mikroskop mit 400-facher Vergrößerung, Carl Zeiss, Oberkochen
2. Attofluor Digital Imaging Systems, Rockville, Maryland (USA)
mit der Software Attofluor Ratiovision

2.2 Materialbezug

Die für die Untersuchung benötigten Reagenzien wurde wie folgt bezogen:

von der Firma Abbott Laboratories, Chicago (USA):

Nembutal Sodium Solution

von der Firma Aldrich-Chemie, Steinheim:

Natriumhydrogencarbonat ($\geq 99,7\%$)

von der Firma Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg

GLP-1

von der Firma Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey (USA):

Multiwell Gewebekulturplatten (6 Vertiefungen)

von der Firma Biolog, Bremen:

Rp-cAMPs, Sp-cAMPs, cpt-cAMPs

von der Firma Biomol Research Laboratories, Inc., Hamburg:

Forskolin, H-89

von der Firma Boehringer, Mannheim:

Triton X-100, 10%ig in wässriger Lösung

von der Firma Calbiochem, Bad Soden:

KT5720, Genistein, Daidzein, Herbimycin A

von der Firma Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld:

männliche DBA/2 Mäuse

von der Firma Fluka, Buchs (Schweiz):

EGTA (purum, p. a.)

von der Firma Greiner GmbH, Frickenhausen:

Gewebskulturflaschen 250ml; Zentrifugenröhrchen 50ml

von der Firma HELLMMA Präzisionsküvetten:

Küvetten Typ 101-05 10mm

von der Firma Gibco Life Technologies, Inc., Eggenstein:

Penicillin, EDTA, fötales Kälberserum, HBSS, RPMI 1640 Medium, Streptomycin, Mercaptoethanol, Trypsin/EDTA (Solution 1X)

von der Firma Merk, Darmstadt:

Calciumchlorid-Dihydrat (>99,5%, p. a.); Salzsäure (1M); Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (p. a.); D(+)-Glukose-Monophosphat; Magnesiumchlorid-Hexahydrat (p. a.); Magnesiumsulfat-Heptahydrat (p. a.); Magan-(II)dichlorid (p. a.); Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (p. a.); Natriumhydroxid (Plätzchen; p. a.); Neutralrot;

von der Firma Molecular Probes, Eugene, Oregon (USA):

Fura-2-acetoxymethylester; Fura-2-Natrium-Salz; Bisoxonol (B-413)

von der Firma Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich:

Gewebskulturschalen 140mm * 20mm

von der Firma Renner GmbH, Dannstadt:

25ml Spinner-Gefäß aus hitzebeständigem Glas

von der Firma Roth GmbH, Karlsruhe:

Kaliumchlorid ($\geq 99,5\%$, p. a.); Natriumchlorid ($\geq 99,5\%$, p. a.); Tris (p. a.)

von der Firma Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg:

Kollagenase (Clostridium histolyticum - 0,78 PZ U/mg); DMSO (reinst, research grade); HEPES (analytical grade);

von der Firma Sigma-Chemie, Steinhofen:

DTPA (p. a.); Staurosporin

2.3 Methoden

2.3.1. Zellkultivierung der INS-1 Zellen

Die in dieser Arbeit verwendete klonale Zelllinie INS-1 stammte von C.B. Wollheim, Universität Genf. Sie wurde aus einem transplantablen Insulinom entwickelt. Das Insulinom wurde in einer Albino-Ratte des NEDH (New England Deaconess Hospital) Stammes durch Ganzkörperbestrahlung (566 Tage 10J/kg) erzeugt [Chick et al., 1977]. Nach Zugabe von 50 μ M 2-Mercaptoethanol (2-ME) entwickelte sich eine langsam wachsende, hochdifferenzierte insulinhaltige Zelllinie (INS-1 Zelllinie) [Asfari et al., 1992]. Die biochemischen, funktionellen und morphologischen Eigenschaften der INS-1 Zellen wurden in Kapitel 1.10 beschrieben.

Zur Zellzucht wurde RPMI 1640 verwendet mit Zusatz von 10Vol-% fötalem Kälberserum (FCS), 100U Penicillin/ml, 100 μ g Streptomycin/ml, 50 μ M Mercaptoethanol, 1 μ M Natriumpyruvat und 10mM HEPES/NaOH mit pH von 7,4. Die Zellen wurden bei 37° C unter Begasung mit 95%O₂ und 5% CO₂ im Inkubator (Heraeus B 5061 EK /CO₂) gezüchtet.

Die INS-1 Zelllinie wurden in der 80. Passage von C.B. Wollheim, Universität Genf, übernommen. Zwei 75cm² großen Gewebeskulturflaschen der Firma Greiner Labortechnik dienten als Stammkulturflaschen, die zu 70-80% bewachsen waren. Die INS-1 Zellen wachsen dabei adhärent auf der Kunststoffoberfläche.

In regelmäßigen Abständen, bevor die Zellen konfluent gewachsen waren, erfolgte eine Neuaussaat. Dazu wurden die Zellen unter Verwendung von 0,025% Trypsin und 0,27mM EDTA von der Unterlage abgelöst. Durch Überführen der Zellsuspension in 10ml kaltes Kulturmedium wurden die Trypsinaktivität vermindert und das Andauern der Zellmembranproteine verhindert. Nach zweimaliger Zentrifugation (5min., 80 x g bei 800rpm) und Abpipettierung des Überstandes wurden die Zellsuspension erneut in mit 37° C warmen Kulturmedium gefüllten Zellkulturflaschen ausgesetzt. Die Verdünnungen der jeweiligen Aussaat betragen bei 7 Tagen Wachstum 1:4 bis hin zu 1:7 bei 10 Tagen Wachstum.

In Abständen von 3 Tagen wurde das Nährmedium gewechselt, indem das verbrauchte von den adhärent wachsenden Zellen abpipettiert und durch neues auf 37° C angewärmtes Medium ersetzt wurde. Bei einem Verhältnis von 0,3-0,5ml/cm² wurde eine Dicke der Mediumschicht von ca. 3-4mm nicht überschritten, um eine ausreichende Gasdiffusion zu gewährleisten.

2.3.2 Intrazelluläre Calciummessung mit dem Fluoreszenzindikator Fura-2

Wie bereits in Kapitel 1.7 beschrieben, spielt Calcium bzw. die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. So führt bei β -Zellen der Langerhansschen Inseln GLP-1 bei ausreichender Glukosekonzentration letztlich zu einer Erhöhung des freien zytosolischen Calciums und zur Exozytose insulinhaltiger Granula [Yada et al., 1993; Lu et al., 1993]. In dieser

Arbeit wurde die Messung der intrazellulären Calciumspiegel dazu genutzt, die vorgeschalteten, an der Signaltransduktion beteiligten Proteinkinasen zu untersuchen.

Es wurde somit eine Messmethode benötigt, mit der man ausreichend genau den intrazellulären Calciumgehalt darstellen kann. Dazu eignet sich ein Fluoreszenzindikator, der freie zytosolische Calciumionen bindet und durch die Komplexbildung eine Änderung der Exzitations- oder Emissionsspektren bewirkt. Diese Änderungen können photometrisch erfasst werden. Mit Hilfe entsprechender Kalibrierung können die Verhältniswerte in absolute Calciumkonzentrationen umgerechnet werden. Zumeist werden für die Calciummessung Fluoreszenzindikatoren wie Quin-2, Fura-2 oder Indo-2 verwendet, die alle vom Calcium-Chelator BAPTA abgeleitet wurden und eine hohe Calciumselektivität haben (Abbildung 2.1) [Tsien et al., 1980].

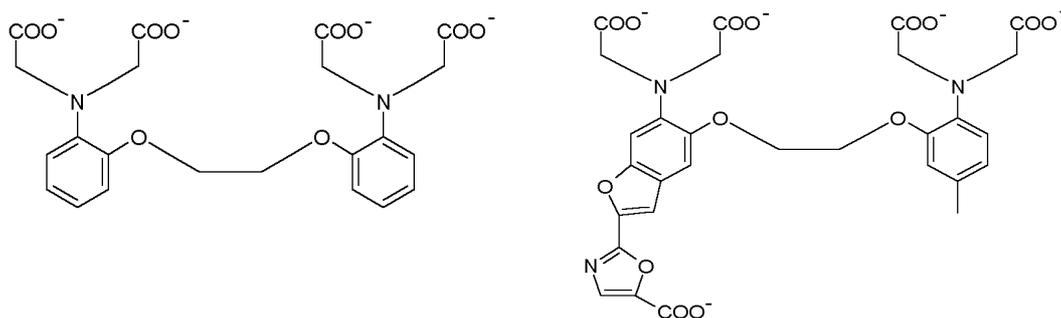


Abbildung 2.1: Molekularstruktur von BAPTA

Fura-2

Wir führten die hier aufgeführten Versuche mit dem Pentacarboxylat Fura-2 durch. Die Vorteile sind dabei, dass Fura-2 zum Beispiel gegenüber Quin-2 ca. 30 mal heller ist, so dass zum Beladen der Zellen niedrigere Dosen verwendet werden können als bei den anderen Fluoreszenzindikatoren. Es bleicht weniger schnell und hat eine bessere Calciumselektivität gegenüber Magnesium [Grynkiewicz et al., 1985].

Bei Fura-2 führt die Komplexbildung mit Calcium zu einer deutlichen Verschiebung der maximalen Exzitations- bzw. Absorptionswellenlänge in den Bereich niedrigerer Wellenlängen, während das Emissionsspektrum nahezu unverändert bleibt. Unter Standardbedingungen (120mM KCl, pH 7,05 bei 37° C) liegt in der Calcium-freien Form das Exzitationsmaximum bei ca. 362nm, das Emissionsmaximum bei 512nm.

Nach Komplexbildung mit Calcium hat Fura-2 ein Exzitationsmaximum bei einer Wellenlänge von ca. 335nm und ein Emissionsmaximum von 505nm (Abbildung 2.02) [Grynkiewicz et al., 1985]. Bei Sättigung mit Calcium erhöht sich die Exzitation bei einer Wellenlänge von 340nm dreifach, während sie bei 380nm um den Faktor 10 abfällt, so dass für die Messungen in der Literatur diese beiden Wellenlängen verwendet werden. Der maximale Absorptionskoeffizient liegt unter den oben genannten Standardbedingungen bei $33 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [Cobbold et al., 1987].

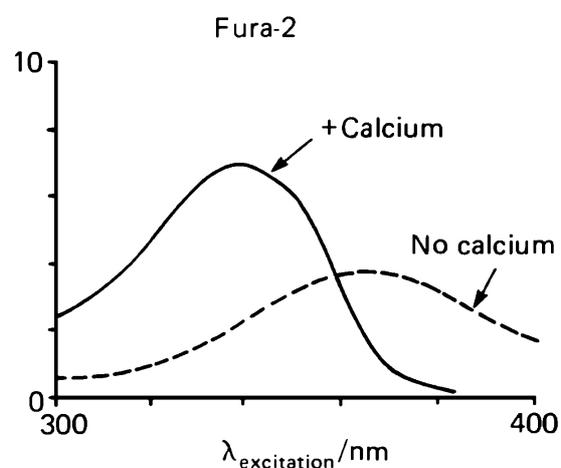


Abbildung 2.2: Exzitationsfluoreszenzspektrum von Fura-2
[aus Cobbold et al. 1987]

Die Dissoziationskonstante (K_d) beträgt unter oben genannten Standardbedingungen 224 nmol/l . Der normale basale intrazelluläre Calciumspiegel (um $0,1-0,01 \mu\text{mol/l}$) liegt somit deutlich unter der halbmaximalen Sättigung von Fura-2 und genaue Calciummessungen können in einem Bereich von $0,1-1 \mu\text{mol/l}$ erfolgen. Fura-2 bildet mit Calciumionen im Verhältnis von 1:1 Komplexe, so dass im mittleren Bereich um die Dissoziationskonstante das Verhältnis von Fluoreszenz und intrazellulärer Calcium-Konzentration linear ist [Cobbold et al., 1987].

Da es sich bei den Versuchen um Messungen des intrazellulären Calciums handelt, kann das hydrophile Fura-2 selbst nicht verwendet werden. Das Derivat Acetoxymethylester, Fura-2 AM, ist demgegenüber lipophil und membrangängig, bindet jedoch kein Calcium. Bei der Inkubation der Zellen mit Fura-2 AM perfundiert dieses in

den Intrazellulärraum, wo es durch Esterasen in das Calcium-sensitive Fura-2 gespalten wird. Das Fura-2 - wieder hydrophil - wird dann im Intrazellulärraum gehalten. Das extrazellulär verbliebene Fura-2 AM kann nach ausreichender Inkubation ausgewaschen werden [Hayashi et al., 1994].

Je nach Zellart besteht ein beachtlicher Fura-2-Efflux, das heißt, dass Fura-2 in den Extrazellulärraum diffundiert bzw. transportiert wird. Durch die dort deutlich höhere Calciumkonzentration wird die Messung gestört und eine falsch hohe Fluoreszenz gemessen. Die Messwerte der intrazellulären Calciumkonzentration müssen unter Berücksichtigung des Fura-2-Effluxes entsprechend korrigiert werden. Hierzu werden während bzw. nach der Messung Mangananionen zugegeben. Die Mangananionen, die Fura-2 deutlich stärker binden als Calcium, bilden mit dem extrazellulären Fura-2 einen nicht-fluoreszierenden Fura-2-Mangan(II)-Komplex (Quenchen), so dass das extrazelluläre Fura die Messung nicht mehr beeinflusst [Grynkiewicz et al., 1985].

Sulfinpyrazon, ein Urikosurikum, soll im Rahmen einer allgemeinen Transporterhemmung die intrazelluläre Fura-Sequestrierung und den Fura-2-Efflux um ein Vielfaches verringern. So konnte nach Zugabe von 250µM Sulfinpyrazon keine Fluoreszenz durch extrazelluläres Fura-2 beobachtet werden. Bei den Messungen, bei denen Sulfinpyrazon verwendet wurde, reichte ein einmaliges Quenchen am Ende der Messung aus [Bode et al., 1994].

2.3.3 Messung der zytosolischen Calciumkonzentrationen bei Zellen der β -Zelllinie INS-1

Für die Messung der zytosolischen Calciumkonzentrationen wurden die INS-1 Kolonien nach einem Wachstum von 7-10 Tagen bei ca. 70-80%ig bewachsener Kulturschale erneut wie unter Kapitel 2.3 beschrieben mit Trypsin und EDTA von der Unterlage gelöst, zentrifugiert und abpipettiert. Nachfolgend wurde die Zellsuspension zur Regeneration für 2,5h bei 37° C in eine Spinnerkultur gegeben, die abweichend zum sonst verwendeten Wachstumsmedium 5% FCS und 25mM HEPES mit einem pH von 7,4 enthielt.

Nach der Regeneration im Spinnermedium wurden die INS-1 Zellen erneut 5min bei 80 x g zentrifugiert, in 20ml Spinnermedium gegeben und mit dem Calciumindikator Fura-2 beladen. Dazu wurde den INS-1 Zellen zum Spinnermedium 2 μ M Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2 AM; gelöst in DMSO) und 250 μ M Sulfinpyrazon hinzugefügt, welches die intrazelluläre Fura-Sequestrierung um ein Vielfaches verringert. Die Suspension wurde für 30min bei 37° C unter Lichtschutz mit einem Magnetrührer inkubiert. Nach der Beladung mit Fura-2 wurden die INS-1 Zellen für 5min bei 80 x g zentrifugiert und erneut in 20ml Spinnermedium mit 250 μ M Sulfinpyrazon suspendiert. Bis zur Messung wurden sie langsam mit einem Magnetrührer bewegt und unter Lichtschutz bei Raumtemperatur aufbewahrt. Durch die relativ niedrige Temperatur wurde die Stoffwechselaktivität reduziert und die Lebensdauer erhöht.

Bei einer Zelldichte von 10⁶ Zellen/ml in der verwendeten Messküvette zeigten sich die besten Messergebnisse. Um diese Zelldichte zu gewährleisten, wurden 2ml der Fura-2-beladenen Zellsuspension in ein Reagenzglas mit 6ml des modifizierten Krebs-Ringer-Inkubationspuffer gemischt, der aus 136mM NaCl, 4,8mM KCl, 1,2mM MgSO₄, 1,2mM KH₂PO₄, 5mM NaHCO₃ und 25mM HEPES/NaOH bei einem pH von 7,4 bestand. Nach Zentrifugation (5min bei 80 x g) und Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 500 μ l des Krebs-Ringer-Inkubationspuffers gelöst und in die Messküvette überführt. Dem Krebs-Ringer-Inkubationspuffer wurde zur Messung 2mM CaCl₂, 500 μ M Sulfinpyrazon und Glukose in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt und in der Küvette auf ein Endvolumen von 1,5ml aufgefüllt.

Die gefüllte Küvette wurde in die Messkammer des Fluoreszenzspektrometers vom Typ „Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS 50 B“ überführt. Während der Messung wurde die Suspension bei 37° C gehalten und mit einem sich langsam bewegenden Magnetstäbchen in der Küvette gerührt. Die Suspension wurde alternierend bei Wellenlängen von 340 und 380nm angeregt, so dass einer Berechnung des Quotienten der jeweiligen Emissionswerte erfolgen konnte (Ratio-Verfahren). Die Emission wurde jeweils bei einer Wellenlänge von 505nm gemessen. Aufgrund der alternierenden Exzitation waren die bei der Emission aufgezeichneten Werte um 5sek versetzt. Die zeitliche Auflösung wurde über die Integrationszeit der Messung auf 2sek

festgelegt. Zur Verringerung der notwendigen zytosolischen Fura-2-Konzentration wurden maximale Spaltweiten für den Exzitations- (15nm) und Emissionsstrahlengang (20nm) eingestellt. Die Einstellung des Fluoreszenzspektrometers, die Aufzeichnung und die Berechnung der Rohdaten wurde über einen PC (IBM Personal System/2, Model 50Z) mit der Software „Fluorescence Data Manager“ (FLDM) durchgeführt.

Um den genauen Anteil des extrazellulären Fura-2 durch Quenchen zu bestimmen, wurde am Ende jeder Messung 50µM MnCl₂ und 100µM DTPA zugegeben [Bode et al., 1994].

Nachfolgend wurden die Zustände minimaler und maximaler freier Calciumkonzentration aufgezeichnet, damit die zuvor erhobenen Ratio-Werte in absolute Calciumkonzentrationen umgerechnet werden konnten. Zunächst wurde 0,1% Triton X-100 in die Messküvette gegeben und die Zellmembranen der INS-1 Zellen lysiert. Entsprechend der hohen extrazellulären Calciumkonzentration wurden alle freigesetzten Fura-2 Moleküle in Calciumkomplexen gebunden und der Maximalwert (F_{\max}) konnte abgelesen werden.

Durch 5mM EGTA, welches mit je einem Calciumion stabile Komplexe (Chelatkomplex) bildet, wurde das Fura-2 Calcium-frei und der Minimumwert der Calciumkonzentration (F_{\min}) bestimmt. Bei der Bildung des CaEGTA²⁻-Komplexes wurden Wasserstoffionen freigesetzt, so dass zum pH-Ausgleich 30mM Tris-Puffer zugesetzt werden musste [Kao, 1994].

Grynkiewicz et al. entwickelten 1985 einen Algorithmus mit dem anhand des Ratio-Wertes, gemessen bei zwei Wellenlängen (hier 340/380nm) und bei bekannten maximalen und minimalen Calciumkonzentrationen, die exakten gemessenen Calciumwerte berechnet werden kann:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}} = K_d \times (\text{R} - \text{R}_{\min}) / (\text{R}_{\max} - \text{R}) \times (\text{S}_{f2} / \text{S}_{b2})$$

R ist der aktuell gemessene Ratio-Wert. R_{\max} ist der Ratio-Wert bei vollständiger Fura-2-Calciumkomplexbildung, R_{\min} der Ratio-Wert bei vollständig Calcium-freiem Fura-2. So steht in der Formel für den Messwert erzielt bei der Wellenlänge des

Nenners (hier 380nm), einmal bei maximalem freien Calcium (S_{b2}) und bei minimalem freien Calcium (S_{f2}). Die Dissoziationskonstante K_d von Fura-2 liegt bei 224nM (bei 37° C, 120nM KCl, pH 7,05) [Grynkiewicz et al., 1985].

Insgesamt lässt sich so eine Zeit-Konzentrationskurve für den gesamten Messverlauf berechnen.

Bei allen Messungen der zytosolischen Calciummessungen der INS-1-Zellen am Fluoreszenzspektrometer wurden nachfolgende Bedingungen gewährleistet, wenn nicht gesondert angegeben:

- Bei einem Volumen von 1,5ml in der Messküvette wurde die Zelldichte bei 10^6 Zellen/ml gehalten.
- Die Küvette wurde auf 37° C temperiert und die Zellsuspension mit einem Magnetrührer langsam in Bewegung gehalten, um Sedimentation zu verhindern.
- Zur Vermeidung des Fura-2-Efflux wurde vor der Messung 250 μ M Sulfapyrazon zugefügt.
- Es wurde eine Calciumkonzentration von 2mM verwendet.
- Die Glukosekonzentration lag konstant bei 10mM.

2.3.4 Membranpotentialmessungen an INS-1-Zellen mit dem Fluoreszenzindikator Bisoxonol

Parallel zu den Calciumfluoreszenzmessungen wurden Membranpotentialmessungen an Zellen der INS-1-Linie durchgeführt. Hierzu wurde in dieser Arbeit Bis-(1,3-diethylthiobarbiturat)-trimethineoxonol, Bisoxonol, verwendet (Abbildung 2.3).

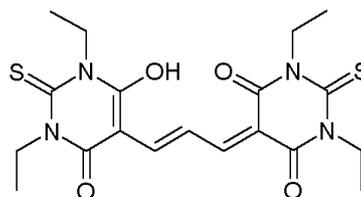


Abbildung 2.3: Bisoxonol

Im Gegensatz zu Fura-2 führt eine Änderung der Bindung bzw. des Membranpotentials bei Bisoxonol nicht zu einer Änderung der Exzitationswellenlänge, sondern zu einer Zunahme bzw. Abnahme der Fluoreszenzintensität. Das lipophile Anion Bisoxonol gelangt vermehrt im depolarisierten Zustand in die Zelle und bindet dort an die Innenseite der Zellmembranen und an intrazelluläre Proteine. Eine erhöhte Depolarisation führt so zu einem vermehrten Einstrom und einer ca. 20fachen Zunahme der Fluoreszenz. Das Exzitationsmaximum des hier verwendeten Bisoxonol liegt bei einer Wellenlänge von 535nm, das Emissionsmaximum bei 560nm. [Haugland, 1994; Rink et al., 1980].

Zur Messung wurden die INS-1 Zellen nach einem Wachstum von 7-10 Tagen bei ca. 70-80%ig bewachsener Kulturschale erneut wie unter Kapitel 2.3 aufgeführt mit Trypsin und EDTA von der Unterlage gelöst, zentrifugiert und abpipettiert. Nachfolgend wurde die Zellsuspension zur Regeneration für 2,5h bei 37° C in eine Spinnerkultur gegeben, die abweichend zum sonst verwendeten Wachstumsmedium 5% FCS und 25mM HEPES enthielt.

Eine länger Inkubation mit Bisoxonol ist nicht notwendig. Die Zellsuspension wurde bei 80 x g 5min zentrifugiert, dekantiert und erneut in 20ml Spinnerlösung gegeben, die bis zur Messung bei Raumtemperatur langsam rührend gehalten wurde.

2ml dieser Zellsuspension wurden in einem Reagenzglas mit 6ml des modifizierten Krebs-Ringer-Inkubationspuffers gemischt, der aus 136mM NaCl, 4,8mM KCl, 1,2 mM MGSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 5mM NaHCO₃ und 25mM HEPES/NaOH bei einem pH von 7,4 bestand. Nach Zentrifugation (5min bei 80 x g) und Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 500µl des Krebs-Ringer-Inkubationspuffers gelöst und in die Messküvette überführt. Dem Krebs-Ringer-Inkubationspuffer wurde zur Messung 200nM Bisoxonol, 2mM CaCl₂ und 10mM Glukose zugefügt und in der Küvette auf ein Endvolumen von 1,5ml aufgefüllt. Wie bei den Calciummessungen mit Fura-2 wurde so eine Zelldichte von 10⁶/ml erreicht. Während der Messung wurde die Zellsuspension bei 37° C gehalten und mit einem sich langsam bewegenden Magnetstäbchen in der Küvette gerührt.

Die Messungen erfolgten am Fluoreszenzspektrometer vom Typ „Perkin Elmer Luminescence Spectrometer LS 50 B“ mit Messung der Exzitation bei 535nm (Spaltbreite 10nm) und der Emission bei 560nm (Spaltbreite 20nm).

Wie in diesem Kapitel oben beschrieben, wurden bei der Messung relative Änderungen der Fluoreszenzintensität als Parameter für die Membranpotentialänderung aufgezeichnet. Um einen relativen Bezug zu schaffen, wurde am Ende jeder Messung 40mM KCl zugefügt, was zur Membrandepolarisation führte. Absolute Werte des Membranpotentials sind mit dieser Fluoreszenzmethode nicht zu bestimmen.

Für alle durchgeführten Messungen des Membranpotentials galten somit die hier angegebenen Bedingungen, sofern nicht anders beschrieben:

- Bei einem Volumen von 1,5ml in der Messküvette wurde die Zelldichte bei 10^6 Zellen/ml gehalten.
- Die Küvette wurde auf 37° C temperiert und die Zellsuspension mit einem Magnetrührer langsam in Bewegung gehalten, um Sedimentation zu verhindern.
- Vor der Messung wurden 200nM Bisoxonol in die Küvette gefügt; eine längere Inkubation war nicht notwendig.
- Es wurde eine Calciumkonzentration von 2mM verwendet
- Die Glukosekonzentration lag bei jedem Versuch konstant bei 10mM.
- Zu Versuchende wurde durch Zugabe von 40mM Kaliumchlorid eine annähernd maximale Depolarisation erzeugt, die als relative Bezugsgröße verwendet wurde.

Die Versuche werden im Ergebnisteil beispielhaft mit Abbildungen aufgeführt, wobei die Ordinatenachse mit willkürliche festgelegten Einheiten die relative Änderungen des Membranpotentials angibt und hier mit dem Symbol $\Delta\Psi$ bezeichnet wird. Ein Anstieg auf der Ordinate entspricht einer Depolarisierung, eine Minderung demgegenüber einer Hyperpolarisation.

2.3.5 Präparation und Kultivierung von Langerhansschen Inseln aus DBA/2-Mäusen

Zur Inselpräparation wurden in dieser Arbeit männliche DBA/2-Mäuse mit einem Gewicht von 18-20g, entsprechend einem Alter von 6-8 Wochen, verwendet. Die Tiere wurden von der Charles Rivers Deutschland GmbH, Sulzheim, bezogen und bei Standard-Labor-Diät und einem Licht-und Temperatur reguliertem Raum gehalten.

Vor der Präparation wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion von Phenobarbital Natrium (3,125mg Nembutal Sodium Solution) anästhesiert. Nach einem medianen Bauchschnitt und zwei Flankenschnitten wurde das Diaphragma eröffnet. Es erfolgte für 10min eine intrakardial Perfusion von 10ml Neutralrot (231mg/l Neutralrot in 0,9%iger NaCl).

Nach der Entnahme der Organe wurden diese in eine gekühlte Petrischale mit Waschlösung gegeben. Die Waschlösung bestand aus HBSS (Hank's balanced salt solution), 20mM HEPES, 10mM Glukose, 1Vol.% FCS; 100U Penicillin/ml und 1µg Streptomycin/ml, pH 7,4. Die Pankreata von 2 Mäusen wurden zusammen in 5ml Kollagenaselösung gegeben (3,5mg Kollagenase/ml Waschlösung, 0,78PZ U/mg) und bei 37° C in einem Wasserbad bei einer Frequenz von 130/min 18min geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension mit dem Gewebsbeständen bei 250 x g 1min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert.

Das verbliebene Pellet wurde mit 5ml Kollagenaselösung (1,75mg/ml Waschlösung; 0,78PZ U/mg) resuspendiert und für 3,5min unter gleichen Bedingungen erneut verdaut. Die noch nicht vollständig verdauten Gewebsstücke sedimentierten im Eis-gekühlten Röhrchen nach unten. Der inselhaltige Überstand wurde dekantiert und zentrifugiert.

Die sedimentierten Gewebsstücke wurden noch weitere zweimal mit 5ml frischer Kollagenaselösung (1,75mg/ml Waschlösung; 0,78PZ U/mg) verdaut. Auch hier wurde dann der inselhaltige Überstand dekantiert und mit 250 x g zentrifugiert. Der dabei letztlich entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet mit den Inseln in 10ml Waschlösung aufgenommen und auf Eis gelegt. Zwei weitere Reinigungsschritte erfolgten, indem jeweils nach Sedimentation der Überstand dekantiert und die verbliebenen Inseln erneut in 10ml Waschlösung gegeben wurden.

Um die exokrine Pankreasreste zu entfernen, wurden die Langerhansschen Inseln einzeln unter mikroskopischer Kontrolle abpipettiert und in Kulturmedium gesetzt. Das Kulturmedium für die Pankreasinseln bestand aus RPMI 1640 (11mM Glukose-Gehalt) unter Zugabe von 10Vol.% FCS, 100µg Streptomycin/ml, 100U Penicillin/ml. Bei 37° C ruhten die Inseln unter Begasung von 95% O₂ und 5% CO₂ im Brutschrank (Heraeus B 5061 EK /CO₂) für 2 bis 6 Tage. Es wurden dabei je 2ml Kulturmedium in eine Vertiefung einer 6-Wellplatte gegeben und 3-4 Inseln dort hineingesetzt. Zum Teil wurden für die Messung mit dem Fluoreszenzmikroskop jeweils mehrere Inseln dabei direkt auf Laminin-beschichtet Deckgläser gegeben (siehe Kapitel 2.8).

2.3.6 Messung der zytosolischen Calciumkonzentrationen in Langerhansschen Inseln mit einem digitalen Fluoreszenzmikroskop

Nach der Präparation und Kultivierung der Langerhansschen Inseln des Pankreas der DBA/2-Maus (siehe Kapitel 2.7) wurden jeweils 3-4 Inseln unter mikroskopischer Kontrolle in 2ml Kulturmedium für Pankreasinseln in eine der Vertiefungen einer Multiwell-Platte (mit 6 Vertiefungen) gegeben und ruhten 2-6 Tage.

Um ein Wegspülen in der superfundierten Messkammer des Mikroskops zu verhindern, wurden die Inseln zum Teil zum Anwachsen direkt für die 2-6 Tage auf Laminin-beschichtete Deckgläser gesetzt. Dazu wurden Glasdeckgläser verwendet, da Kunststoff als Objektträger wegen hoher Eigenfluoreszenz ungeeignet ist. Die Deckgläser wurde zunächst mit Alkohol gereinigt und für eine Stunde in 1M HCl und nachfolgend 30min in 70%igen Alkohol eingelegt. Nach Trocknen unter sterilen Bedingungen wurden 10 μ l Laminin (1mg/ml Stock Solution 1:20 in PBS gelöst) unter Aussparung des Randes auf dem Deckglas verteilt. Die Lamininschicht trocknete erneut unter sterilen Bedingungen und das nun Laminin-beschichtete Deckglas wurde in ein mit dem Kulturmedium für Inseln gefülltes Well gelegt. 3-4 Inseln wurden dann unter mikroskopischer Kontrolle mittig auf dem Deckglas platziert.

Die intrazelluläre Calciummessung erfolgte mit dem Fluoreszenzindikator Fura-2. Die 3-4 Inseln in ein Well wurden mit 5 μ M Fura-2-AM-Ester für 40 min inkubiert.

Das Deckglas wurde zur Messung vorsichtig aus dem Well genommen und als Boden in die superfundierte, nach oben offene Messkammer eingespannt (Versuchsaufbau siehe Abbildung 2.4). Die Messkammer wurde von einem Aluminiumblock umgeben, der, mit Wasser durchströmt, auf 37° C temperiert werden konnte. Das Volumen der Messkammer betrug 700 μ l. Die Inseln wurden über eine peristaltische Pumpe kontinuierlich mit 1ml/min mit verschiedenen Lösungen superfundiert. Die Lösungen wurden in einem 8-Kammer-Reservoir auf 37° C angewärmt.

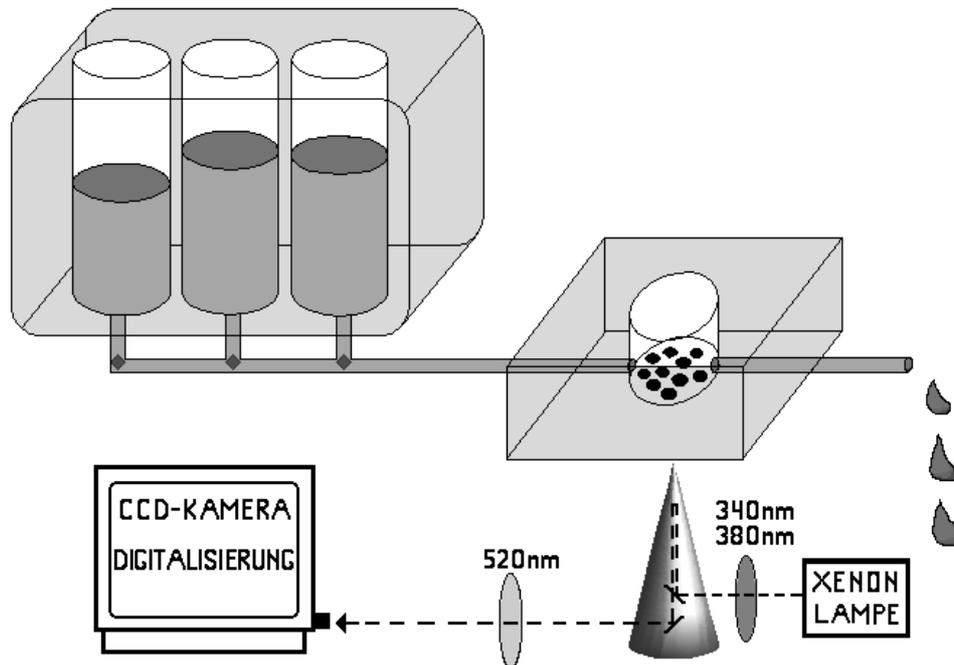


Abbildung 2.4: Versuchsaufbau für die Calciummessungen der Langerhansschen Inseln am Fluoreszenzmikroskop

Die auf laminierte Deckgläser aufgebrachten Langerhansschen Inseln werden, nachdem sie mit Fura-2 inkubiert wurden, mit verschiedenen gewärmten Lösungen überspült. Dabei werden sie von einer Xenon-Lampe bei 340/380nm angeregt. Die Emission bei 520nm wird mit einer Digitalkamera aufgezeichnet und in Calciumspiegel umgerechnet.

Die Messkammer wurde auf den Präparattisch des Zeiss Axiovert Mikroskop 135 TV befestigt. Die Calciummessungen erfolgten mit Hilfe des Zeiss/Attofluor Ratio Vision Digital Imaging System. Als Fluoreszenzlichtquelle diente eine Xenon-Kurzbogenlampe. Die Ratio-Messungen wurden alternierend bei einer Exzitationswellenlänge von 340nm und 380nm und einer Emission bei 520nm durchgeführt. Aufgezeichnet wurden die Emissionswerte bei 400facher Vergrößerung mit einer CCD-Kamera (512 x 512 Bildpunkte) und nachfolgender Digitalisierung [Hayashi et al., 1994]. Die Messintervalle wurden auf eine Messung pro Sekunde festgelegt.

Unter dem Mikroskop konnten die Inseln zentral eingestellt werden und Benutzerdefiniert bestimmte Regionen (Regions of interest; ROI) ausgewählt werden, in denen die entsprechende Calciumkonzentrationen ausgerechnet wurden. Die Berechnung erfolgte nach dem oben aufgeführten Algorithmus (siehe Kapitel 2.5), so dass $[Ca^{2+}]_{int} = K_d \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times (S_{f2} / S_{b2})$ gilt [Grynkiewicz et al., 1985].

Die Kalibrierung des Fluoreszenzmikroskops erfolgt anhand zwei externer Standardlösungen mit definierten Calciumkonzentration (0mM und 2mM Ca^{2+}). Da ohne Zellen und entsprechender Esterase kalibriert wurde, wurde hier Fura-2-Salz mit einer Konzentration von 20 μ M verwendet. Der Calcium-freien Standardlösung war 2mM EGTA zugegeben worden. Je 20 μ l der beide Standardlösungen wurden auf einem Deckglas bei 334nm und 380nm angeregt und bei 520nm Emission aufgezeichnet.

Für die Messungen am Fluoreszenzmikroskop wurde ein Superfusionsstandardpuffer ohne Phosphat verwendet, der wie folgend zusammengesetzt war:

120mM NaCl, 4,7mM KCl, 2,5mM $CaCl_2$, 1,2mM MgCl, 5mM $NaHCO_3$, 20mM HEPES. Der pH wurde bei Raumtemperatur auf 7,6 mit NaOH eingestellt, was einem pH von 7,4 unter Versuchsbedingungen von 37° C entsprach. Die Glukosekonzentration wurde während es Versuches selbst, wie angegeben, geändert, wobei immer mit einer Konzentration von 3mM begonnen wurde.

Sofern nicht anderes aufgeführt, wurde bei allen Versuchen an Langerhansschen Inseln die folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Es wurde eine Langerhanssche Insel mit 400-facher Vergrößerung auf dem Objektträger eingestellt und mit 25-35 verschiedenen Regions of interest (ROI), überwiegend im zentralen Bereich der Insel, versehen.
- Messkammer und Superfusionslösungen wurden entsprechend der Versuchsanordnung (Abbildung 2.4) auf 37° C temperiert gehalten.
- Die Calciumkonzentration die Superfusionspufferlösung lag bei 2,5mM.
- Jeder Versuch wurde mit einer Glukosekonzentration von 3mM begonnen und nachfolgend auf 11mM gesteigert.

Vorversuche (nicht gesondert dargestellt) bezüglich verschiedener Glukosekonzentrationen waren mit 3, 8, 11, 15 und 20mM durchgeführt worden. Wenn

die Versuche mit einer Superfusion von 3mM Glukose begonnen und dann bei 11mM fortgeführt wurden, zeigte sich eine deutliche, mittelgroße Calciumerhöhung, so dass Raum für zusätzliche Calciumerhöhungen blieb. So wurden alle weiteren Experimente auf diese Weise ausgeführt.

Um die Intaktheit der β -Zellen nachzuweisen, wurde zunächst bei jedem Versuch die Reaktion der Langerhansschen Inseln auf die Erhöhung der Glukosekonzentration von 3 auf 11mM beobachtet. Inseln, die nicht auf diese Erhöhung reagierten, wurden als defekt bewertet und aus der weiteren Beurteilung ausgeschlossen.

Weiterhin wurden die Calciumoszillationen beobachtet. In der Literatur werden dabei zumeist zwei Arten von Calciumoszillationen beschrieben. Zum einen gibt es hochfrequente Oszillationen mit Frequenzen in Bereich von 2-7 Oszillationen/min, bei denen in abhängig von der Glukosekonzentration die Plateauphase der Oszillation zunimmt. Zum anderen wird eine Form langsamer Oszillationen aufgeführt mit Frequenzen zwischen 0,2 und 0,5/min, deren Plateau bei Änderungen der Glukosekonzentration unverändert bleibt. Die langsamen Oszillationen sollen dabei eher an einzelnen β -Zellen auftreten [Bergsten 2002, Valdeomillos et al., 1989]. Gilon et al. beschrieben, dass die Kulturdauer und Kulturbedingungen die Form dieser Glukose-induzierten Oszillationen verändern. So wurden alle Inseln, die nicht oder unzureichend oszillierten ebenso von der weiteren Bearbeitung ausgegrenzt [Gilon et al., 1994].

2.3.7 Eigenschaften der verwendeten Substanzen

Im folgenden Kapitel sollen kurz die Eigenschaften der wichtigsten, verwendeten Substanzen beschrieben werden.

2.3.7.1 Forskolin

Forskolin (7 β -acetoxy-8,13-epoxy-1 α ,6 β ,9 α -trihydroxy-labd-14-en-11-one Colforsin), siehe Abbildung 2.5, ist ein zellpermeables Diterpen, welches aus der indischen Pflanze *Coleus forskohlii* extrahiert wurde. Es aktiviert direkt die Adenylatzyklase, erhöht so die cAMP-Konzentration deutlich und wird seit vielen Jahren verwendet, um das Adenylatzyklase/cAMP-System wissenschaftlich zu untersuchen. Im Gehirngewebe der Ratte benötigt man zum Beispiel eine

Konzentration von $4\mu\text{M}$ Forskolin, um die Adenylatzyklaseaktivität 50%ig zu erhöhen (K_s). Bei S49-Zellen beträgt die K_s $5\mu\text{M}$ [Laurenza et al., 1987].

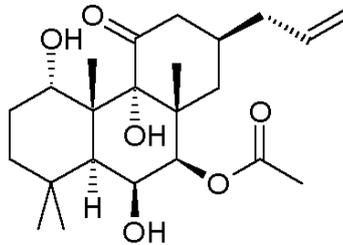


Abbildung 2.5: Forskolin

Anhand von markiertem Forskolin konnte gezeigt werden, dass es an der Adenylatzyklase verschiedene Klassen von Bindungsstellen gibt. Bei der Bindungsstelle mit der höchsten Affinität interagiert Forskolin nicht mit der Adenylatzyklase allein, sondern mit einem Komplex, den diese mit der G_s - α -Untereinheit des G-Proteins bildet. Forskolin kann jede der neun bislang identifizierten Adenylatzyklasen aktivieren, wenn auch mit unterschiedlicher Effektivität. Forskolin hat aber noch viele weitere Bindungsstellen und interagiert auch mit anderen Proteinen wie Glukosetransportern und Ionenkanälen [Insel et al., 2003].

Bei pankreatischen β -Zellen der Maus zeigte Forskolin einen starken, Dosis-abhängigen und Glukose-abhängigen Anstieg der cAMP-Konzentration. So waren bei niedrigen Glukosekonzentrationen (3mM) hohe Dosen Forskolin von $20\mu\text{M}$ notwendig, um die Insulinsekretion zu verdoppeln. Eine Erhöhung der Insulinfreisetzung bei 7mM Glukose zeigte sich demgegenüber schon bei $5\mu\text{M}$ Forskolin und bei 10mM Glukose lag die halbmaximale Erhöhung der Insulinsekretion bereits bei $1\mu\text{M}$ [Henquin et al., 1984]. In der Literatur wurden meist Konzentrationen zwischen 1 und $10\mu\text{M}$ angewandt, wie zum Beispiel $2\mu\text{M}$ an Maus-Inseln in der Arbeitsgruppe um Gromada [Gromada et al., 1997].

Wie unter Kapitel 1.4 aufgeführt ist der GLP-1-Rezeptor an der intrazellulären Seite an ein G-Protein gekoppelt und einer Aktivierung führt über die Adenylatzyklase zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration [Segre et al., 1993; Göke R. et al., 1988]. In dieser Arbeit wurde Forskolin somit neben GLP-1 verwendet, um die

Signaltransduktion distal des Rezeptors bzw. des G-Proteins zu untersuchen und mögliche Nebeneffekte, die die Proteinkinase-Hemmstoffe am Rezeptor selbst haben könnten, mit zu berücksichtigen.

2.3.7.2 KT 5720

KT 5720, Abbildung 2.6, ist ein 9-n-Hexylester-Derivat der Gruppe der K252-Verbindung, (8R*,9S*,11S*)-(-)-9-hydroxy-9-n-hexylester-8-methyl-2,3,9,10,-tetrahydro-8,11-epoxy-1H,8H,11H-2,7b,11a-triazadibenzo[a,g]cycloocta[c,d,e]trin-den-1-one.

Viele Derivate von K252 sind unspezifische Proteinkinasehemmstoffe. Die Weiterentwicklung, KT 5720 selbst, ist ein spezifischer Hemmstoff für Proteinkinase A, wobei die Konzentration für eine halbmaximale Inhibition (K_i) für diese cAMP-abhängige Proteinkinase bei 60nM liegt, während sie für die Proteinkinase C und die cGMP-abhängige Kinase (Proteinkinase G) über 2000nM beträgt [Kase H. et al., 1987].

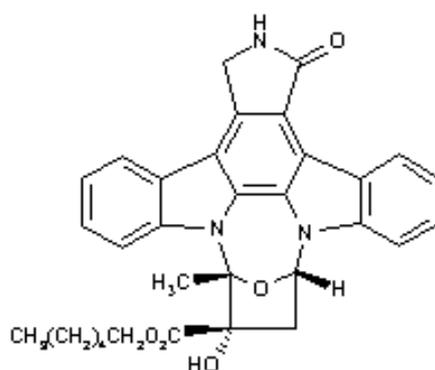


Abbildung 2.6: KT 5720

2.3.7.3 Rp-cAMPs versus Sp-cAMPs

Durch Zuführen eines Schwefelatoms zu zyklischem Adenosin-3',5-monophosphat (cAMP) entstehen diastereomerische Phosphothioat-Derivate. Bei Bindung des Schwefelatoms am äquatorialen exozyklischen Sauerstoff entsteht der Rp Diastereomer des zyklischen Adenosin-3',5'-Monophosphothioats, Rp-cAMPs (Abbildung 2.7), ein membrangängiger Hemmstoff für cAMP-abhängige Vorgänge. Das Sp Diastereomer, Sp-cAMPs, das bei Bindung des Schwefelatoms am axialen Sauerstoff gebildet wird, ist demgegenüber ein aktives Analogon von cAMP [Parker Botelho et al., 1988a].

Experimente zeigten, dass es bei der jeweils benötigten Rp-cAMPs Konzentration auf mehrere verschiedenen Faktoren ankommt, wie den Membraneigenschaften. Die

halbmaximale Inhibition (K_I) liegt bei der isolierten cAMP-abhängigen Proteinkinase bei $8,3\mu\text{M}$ und bei cAMP-abhängigen Prozessen in Hepatozyten zwischen $1-10\mu\text{M}$. Rp-cAMPs ist im kompetitivem Wettbewerb mit dem endogenen cAMP bezüglich der Bindungsstelle an der regulatorische Einheit der Proteinkinase [Parker Botelho et al., 1988a; Rothermel et al., 1984a].

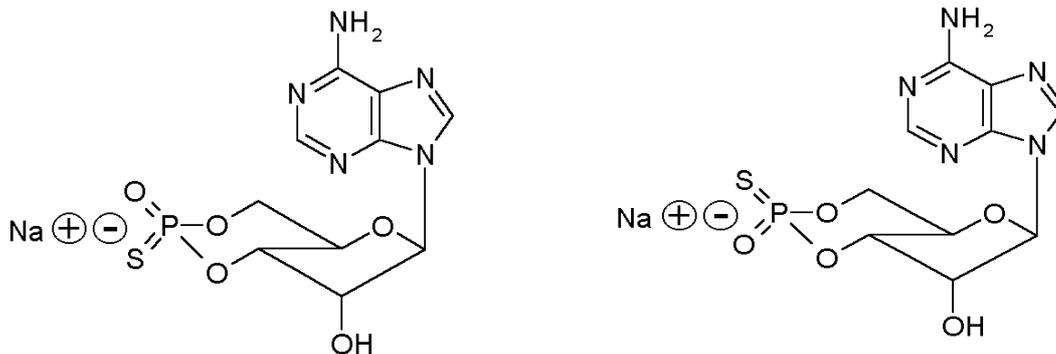


Abbildung 2.7:

Rp-cAMPs

Sp-cAMPs

Die Bindungsaffinität von Rp-cAMPs an der Proteinkinase A ist gegenüber [^3H]-cAMP 170fach reduziert; der Abbau von Rp-cAMPs durch Phosphodiesterase ist gegenüber cAMP deutlich erniedrigt, so dass nach 4 Stunden weniger als 30% degradiert wird. Versuchsreihen zur Inhibition der Glukagon-induzierten Glukosesekretion an Leberzellen zeigten, dass die Rp-cAMPs-Wirkung über einen Zeitraum von 15 bzw. 30 min. zunimmt. So ist eine länger Inkubation auch in Anbetracht der niedrigen Abbaurate sinnvoll [Schaap et al., 1993; Rothermel et al., 1984a].

Unter Verwendung von Sp-cAMPs können Rückschlüsse auf die Zellpermeabilität und den Wirkungseintritt dieser Phosphothioat-Derivate gezogen werden. Sp-cAMPs ist ein vollständiger Agonist der cAMP-abhängigen Proteinkinase, wobei die halbmaximale Aktivierung bei isolierter Proteinkinase A vom Typ I und II bei $1\mu\text{M}$ bzw. $1,78\mu\text{M}$ liegt [Van Haastert et al., 1984].

2.3.7.4 H-89

Bei der Weiterentwicklung des Calmodulin-Antagonisten Naphthalinsulfonamid, kurz W-7, zeigte sich, dass die Derivate von W-7 verschiedenste Proteinkinasen

hemmen können. H-8 (N-[2-(methylamino)ethyl]-5-isoquinoline sulfonamid) ist ein potenter Hemmstoff speziell für die Proteinkinasen, die von zyklischen Nukleotiden abhängig sind. Dabei kommt es zu einer reversiblen, kompetitiven Hemmung bezüglich ATP mit einer jedoch deutlich schlechteren Bindungskonstante als ATP selbst. Die K_I für H-8 beträgt für die Proteinkinase A $1,2\mu\text{M}$, für Proteinkinase G $0,48\mu\text{M}$.

Das hier verwendete Derivat H-89, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinoline sulfonamid) (Abbildung 2.8) zeigte eine deutliche Zunahme der Selektivität gegenüber Proteinkinase A mit einer K_I von $0,04\mu\text{M}$ und einer Abnahme gegenüber Proteinkinase G mit einer K_I von $0,34\mu\text{M}$. Andere Kinasen werden kaum noch beeinflusst (200-300fach schwächer) [Chijiwa et al., 1990; Hidaka H et al., 1991].

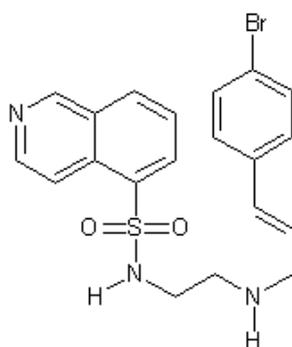


Abbildung 2.8: H-89

Kürzlich wurde nachgewiesen, dass H-89 neben seiner potenten Hemmung von Proteinkinase A ebenfalls mit einer hohen Hemmungskonstante (K_I 270nM) Proteinkinasen vom Typ Rho-Kinasen (ROCK-II) hemmt. In einigen Zellarten, wie bestimmten Nervenzellen, können sich die beiden Proteinkinasen (PKA und ROCK) gegensätzlich beeinflussen. GPT-aktiviertes Rho führt zu einer erhöhten Aktivität von ROCK I und II. Proteinkinase A phosphoryliert RhoA und vermindert so die Bindung und Aktivierung von ROCK. In Zellen, bei denen Rho oder ROCK eine Rolle in der Signaltransduktion spielen, sollte H-89 somit nicht als einziger spezifischer PKA-Hemmstoff verwendet werden [Leemhuis et al., 2002].

2.3.7.5 Genistein / Daidzein

Genistein, 4',5,7-Trihydroxyisoflavon, Abbildung 2.9, ist ein für die Gruppe der Tyrosinkinasen oft verwendeter, spezifischer Hemmstoff. Gegenüber den verschiedenen

Tyrosinkinasen ist dieses Isoflavon jedoch nicht selektiv.

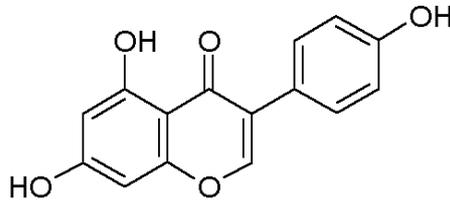


Abbildung 2.9: Genistein

Genistein inhibiert unter anderem die Tyrosinkinasen pp60^{v-src} und pp110^{gag-fee} ebenso wie die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors (epidermal growth factor). Die halbmaximalen Hemmungskonzentrationen sind entsprechend der jeweiligen Tyrosinkinase unterschiedlich. So wird bezüglich der Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors eine K_I von 2,6 μ M, für die pp60^{v-src} von 7 μ M in vitro beschrieben. In intakten Zellen liegt die K_I für die EGF-induzierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors bei 30 μ M. Bei der Inhibition handelt es sich hinsichtlich ATP um einen kompetitiven, gegenüber dem Phosphatakzeptor, zum Beispiel Histon H2B, um einen nicht-kompetitiven Mechanismus. Die Wirkung auf die cAMP-abhängige Proteinkinase, die Phosphorylasekinase und die Proteinkinase C ist bei K_I -Werten von weit über 100 μ M sehr gering und im Vergleich zu den Tyrosinkinasen zu vernachlässigen [Akiyama et al., 1987].

Neben dem Einsatz als Tyrosinkinase-Hemmstoff in der Forschung wird der Einsatz von Genistein in weiten Feldern der Medizin untersucht, wie zum Beispiel als krebopräventives Präparat [Dixon et al., 2002]

In Vergleich zu Genistein wird Daidzein (4',7'-Dihydroxyisoflavon) oft als negative Kontrolle verwendet, da Daidzein, dem gegenüber Genistein eine OH-Gruppe fehlt, Tyrosinkinasen kaum hemmt ($K_I > 100\mu$ M) [Akiyama et al., 1987].

2.3.7.6 Herbimycin A

Das Antibiotikum Herbimycin A, Abbildung 2.10, ist ebenfalls ein unspezifischer Antagonist für verschiedene Tyrosinkinasen. Dabei scheint Herbimycin A die Tyrosinkinase, wie zum Beispiel die p60^{v-src}, direkt zu inaktivieren, indem es mit SH-Gruppen der Kinase konjugiert. Neben vielen Mitgliedern der src-Familie hemmt Herbimycin A auch die Tyrosinkinase p210^{bcr-abl} und induziert den Abbau von Tyrosinkinaserzeptoren wie dem IGF-Rezeptor (Insulin-like growth factor). Währenddessen hat es keinen Einfluss auf die Gruppe der Serine-/Threoninkinasen wie der cAMP-abhängigen Proteinkinasen oder die Proteinkinase C. Die Konzentration, die zur halbmaximalen Hemmung führt, hängt von der jeweiligen Kinase ab und beträgt zum Beispiel bei der Tyrosinkinase p60^{c-src} 900nM [Fukazawa et al., 1991, Sepp-Lorenzino et al., 1995].

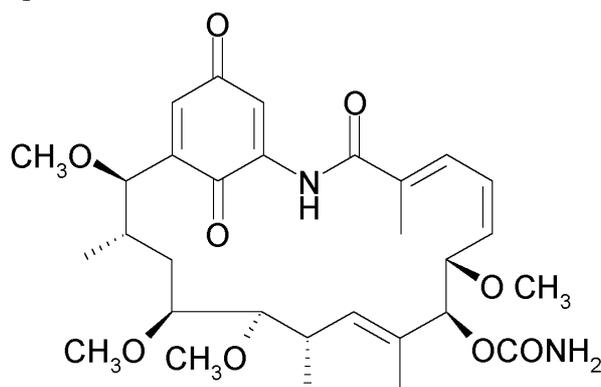


Abbildung 2.10: Herbimycin A

2.3.7.7 Staurosporin

Staurosporin, Abbildung 2.11, wurde entdeckt als schwach wirksames antimikrobielles Alkaloid-Antibiotikum, welches von *Streptomyces species* produziert wird. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es ein sehr potenter, jedoch unspezifischer Hemmstoff verschiedener Proteinkinasen ist, sowohl der Serin/Threonin- als auch Tyrosinkinasen. Ebenso ist es ein sehr starker Inhibitor der Phospholipid/Ca²⁺-abhängigen Proteinkinase, Proteinkinase C.

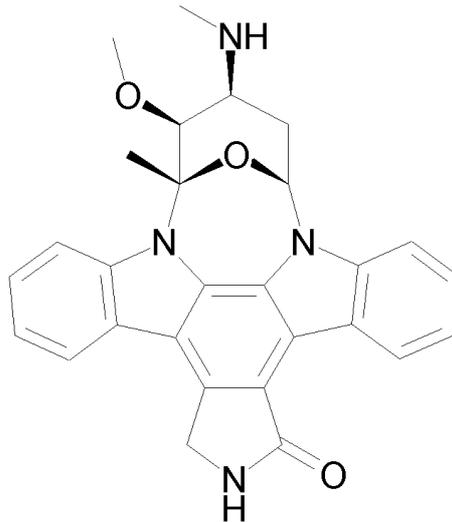


Abbildung 2.11: Staurosporin

Die K_i liegt bei der Proteinkinase C bei 3nM. Für die cAMP-abhängigen Proteinkinase A beträgt die K_i 8nM, für die cGMP-abhängige Proteinkinase G 7nM und für die Tyrosinkinaseaktivität von p60^{v-src} 6nM. Staurosporin scheint bei der Hemmung der Proteinkinase C das proteolytisch entstehende, katalytische Fragment direkt zu hemmen. Der genaue Vorgang ist jedoch nicht bekannt [Rüegg et al., 1989].

3. Ergebnisse

3.1 Reaktion der INS-1-Zellen und β -Zellen der Langerhansschen Inseln auf GLP-1 und Forskolin

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration und des Membranpotentials bei INS-1-Zellen und β -Zellen der Langerhansschen Inseln der Maus die Beteiligung von Proteinkinasen bei der Signaltransduktion von GLP-1 untersucht. Zunächst wurden dazu die Reaktionen der beiden Zelltypen auf GLP-1 und Forskolin selbst in Bezug auf den zytosolischen Calciumspiegel und bei den INS-1-Zellen zusätzlich das Membranpotential analysiert.

3.1.1 Verhalten der INS-1-Zellen auf GLP-1- und Forskolin-Gabe anhand der Messung der intrazelluläre Calciumkonzentration mit Fura-2 am Fluoreszenzspektrometer

Bei den Messungen der zytosolischen Calciummessungen der INS-1-Zellen am Fluoreszenzspektrometer wurden die unter Kapitel 2.5 angegebenen Bedingungen eingehalten.

Wie schon in der Einleitung (Kapitel 1.5) beschrieben wurde, wirkt GLP-1 erst ab einer bestimmten Glukosekonzentration. Bekanntlich konnte bei 2,8mM keine, bei 10mM jedoch eine Stimulation der Insulinsekretion nachgewiesen werden [Holst et al., 1997, Göke et al., 1993, Fehmann et al., 1995b]. Dementsprechend wurden die Versuche, wie oben aufgeführt, mit einer Glukosekonzentration von konstant 10mM durchgeführt.

Zunächst wurde der Effekt von GLP-1 und Forskolin auf den zytosolischen Calciumspiegel betrachtet. Nach Zugabe dieser Substanzen kam es, wie in Abbildung 3.1 beispielhaft gezeigt, zu einer biphasischen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Dabei wurde ein initialer, rasch ansteigender, kurzer Peak von einer plateauförmigen Erhöhung gefolgt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass unter

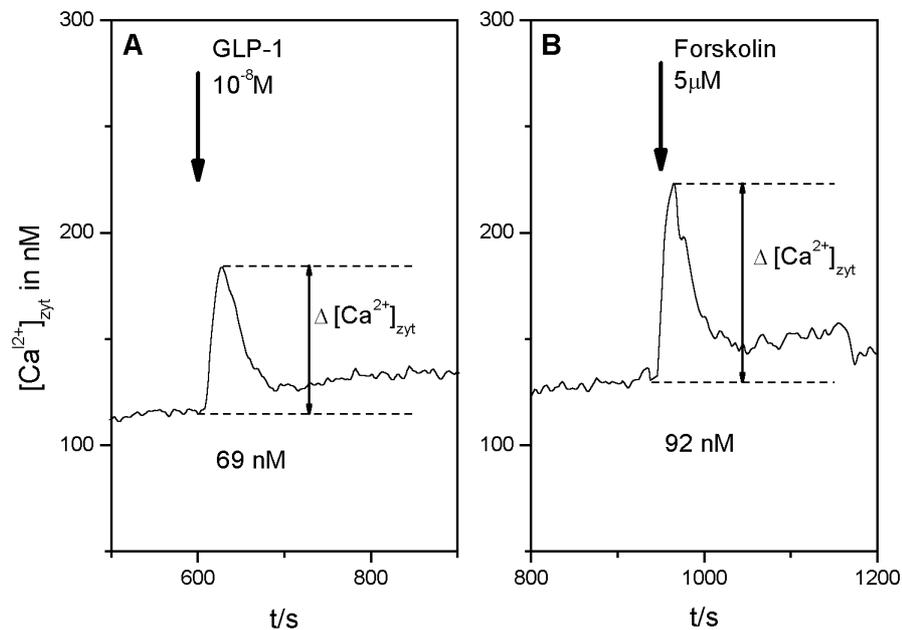


Abbildung 3.1: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der INS-1-Zellen mit Fura-2 am Fluoreszenzspektrometer bei **A** Zugabe von 10^{-8} M GLP-1 und **B** Zugabe von $5 \mu M$ Forskolin. (Exemplarisch für 11 Versuche)

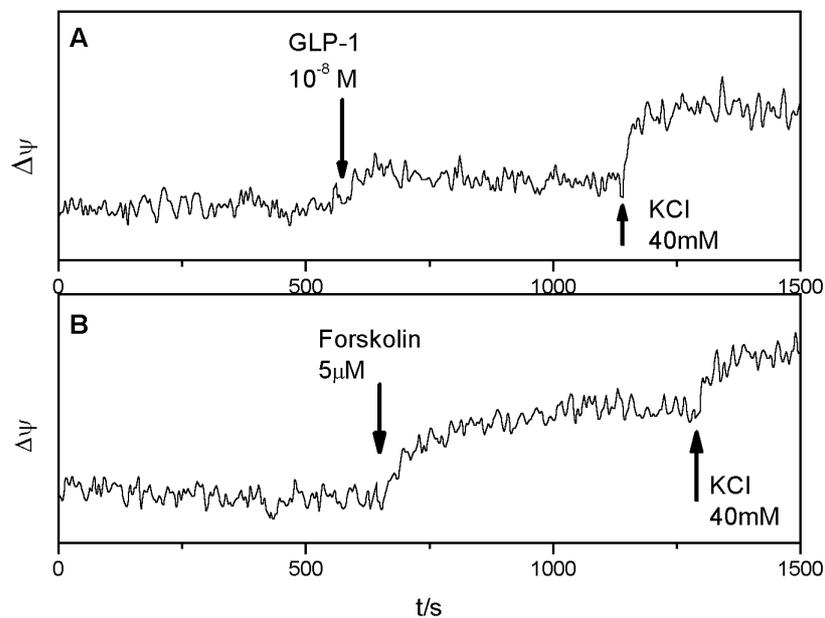


Abbildung 3.2: Darstellung von Änderungen des Membranpotentials ($\Delta\psi$) der INS-1-Zellen mit Bisoxonol am Fluoreszenzspektrometer bei **A** Zugabe von 10^{-8} M GLP-1 und **B** Zugabe von $5 \mu M$ Forskolin. Als Vergleichsgröße für Membranpotentialänderungen gilt die Depolarisation der Zellmembran nach Zugabe von 40 mM KCl. (Exemplarisch für je 7 Versuche)

Verwendung von 10^{-8}M GLP-1 und $5\mu\text{M}$ Forskolin eine maximale Wirkung auftrat, so dass alle weiteren Versuche am Fluoreszenzspektrometer mit diesen Konzentrationen erfolgten.

Die Zugabe von 10^{-8}M GLP-1 führte zu einer maximalen Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels um $65\text{nM} \pm 24\text{nM}$. Bei $5\mu\text{M}$ Forskolin kam es zu einem Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels um $89\text{nM} \pm 23\text{nM}$ jeweils berechnet im Bereich des Peaks (Mittelwert und Standardabweichung aus je 11 Messungen). Im Vergleich der beiden Substanzen erschien das Plateau der Calciumerhöhung bei GLP-1 in Relation zu Forskolin dezent niedriger.

3.1.2 Messungen des Membranpotentials der INS-1-Zellen bei Stimulation mit GLP-1 und Forskolin anhand von Bisoxonol am Fluoreszenzspektrometer

Parallel zu den Untersuchungen der Calciumspiegel der INS-1-Zellen wurden am Fluoreszenzspektrometer Messungen des Membranpotentials mit Bisoxonol durchgeführt.

Auch hier wurden zunächst die Veränderungen des Membranpotentials untersucht, die durch GLP-1 und Forskolin verursacht wurden. Sowohl 10^{-8}M GLP-1 als auch $5\mu\text{M}$ Forskolin führten zu einer raschen, zumeist plateauartigen Depolarisation, wie in Abbildung 3.2 dargestellt. Die durch 10^{-8}M GLP-1-bedingte Depolarisation war in Relation zu der Depolarisation bei $5\mu\text{M}$ Forskolin etwas geringer ausgeprägt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass dabei die beiden angegebenen Konzentration zu einer maximalen Wirkung führen, so dass alle weiteren Untersuchungen mit diesen Konzentrationen durchgeführt wurden.

3.1.3 Verhalten der intrazellulären Calciumkonzentration der Langerhansschen Inseln bei Änderung der Glukosekonzentration am Fluoreszenzmikroskop

Um das Verhalten von β -Zellen in einer möglichst natürlichen Umgebung zu untersuchen, wurden neben den INS-1-Zellen für einen Teil der Versuche Langerhanssche Inseln verwendet, die mittels einer Kollagenasebehandlung aus DBA/2-Mäusen gewonnen worden waren (siehe Kapitel 2.7). Langerhanssche Inseln bestehen zu 70-90 % aus β -Zellen, vorwiegend im Zentrum gelegen, und alle Inselzellen sind elektrisch über so genannte Gap junctions verbunden, so dass die mit Fura-2 am Fluoreszenzmikroskop gemessenen intrazellulären Calciumwerte denen der β -Zellen entsprechen [Valdeolillos et al., 1993, Meda et al., 1986].

Wie beispielhaft in Abbildung 3.3 zu sehen ist, zeigte sich bei 3mM Glukose ein basaler, konstanter intrazellulärer Calciumspiegel von durchschnittlich $117\text{nM} \pm 21,5\text{nM}$. Bei Erhöhung der Superfusionslösung auf 11mM Glukose folgte zunächst eine diskrete, kurz andauernde Absenkung der zytosolischen Calciumkonzentration, der dann ein rascher Anstieg des Calciums auf durchschnittlich maximal 397nM folgte. Der intrazelluläre Calciumspiegel wurde um circa 280nM angehoben. Dieser Anstieg war immer deutlich, bei einer Standardabweichung von 113nM allerdings in seiner Höhe variable (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 56 Experimenten). Nach dieser Spitze fiel die zytosolische Calciumkonzentration leicht ab und die Langerhanssche Insel begann zu oszillieren.

Da, wie oben in diesem Kapitel beschrieben, die einzelnen Zellen der Insel elektrisch mit Gap junction verbunden sind, fand sich auch in allen hier aufgeführten Experimenten, dass diese Oszillationen in den verschiedenen Bereichen der Insel bzw. in den verschiedenen „Regions of interest“ (ROI's) synchron auftraten (siehe Abbildung 3.4a). So wurden die in den Versuchen berechneten Durchschnittswerte der verschiedenen ROIs nicht durch asynchrone Änderungen der Calciumwerte innerhalb einer Insel beeinflusst.

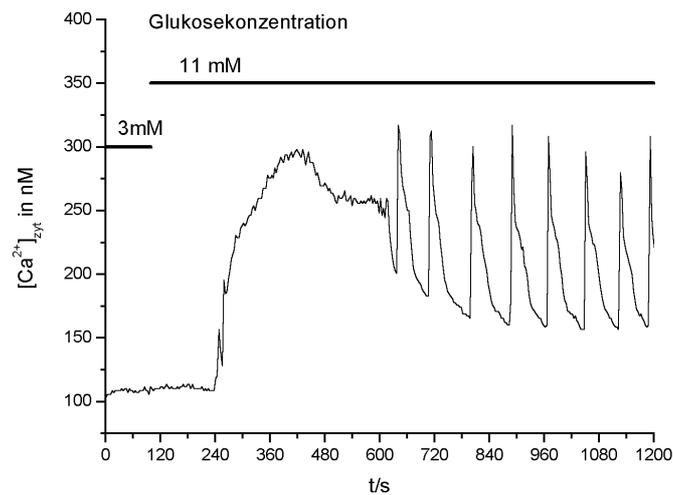


Abbildung 3.3: Exemplarische Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration der Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln bei Änderung der Glukosekonzentration von 3mM auf 11mM. Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 56 Experimenten)

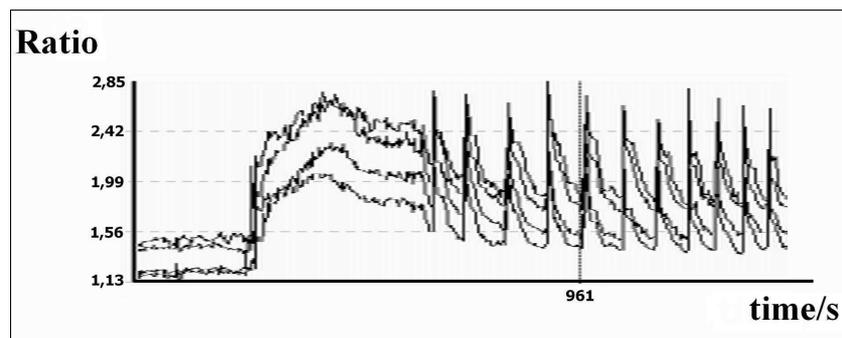


Abbildung 3.4a: Exemplarische Darstellung der Fluoreszenzratio der einzelnen ROIs einer Langerhansschen Insel am Fluoreszenzmikroskop vor der Mittelwertberechnung.

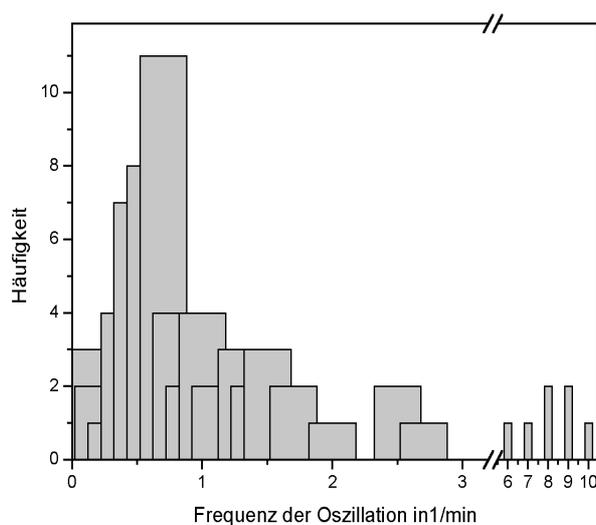


Abbildung 3.4b: Verteilung der Frequenz der Calciumoszillationen der Langerhansschen Inseln am Fluoreszenzmikroskop (Mittelwert und Standardabweichung aus 18 Versuchen).

Die Frequenz der Oszillationen variierte in den einzelnen Versuchen, zeigte aber keine Abhängigkeit von der Inkubationsdauer der Inseln, die in dieser Arbeit zwischen dem zweiten und sechsten Tag gemessen worden waren. Die durchschnittliche Frequenz betrug dabei einer Oszillationen/min mit einer Standardabweichung von 0,8/min (Mittelwert und Standardabweichung aus 18 Versuchen). Der Hauptanteil lag dabei in einem Bereich zwischen 0,4 und 2 Oszillationen/min (Abbildung 3.4b). Die in der Abbildung aufgezeichneten hohen Frequenzen von 6-10/min stellten dabei kleine Oszillationen bzw. Calciumschwankungen dar, die den größeren und langsameren Oszillationen aufgelagert waren.

Wurde zu Versuchsende die Glukosekonzentration auf 3mM erniedrigt, stellte sich, wie in Abbildung 3.5 zu sehen, eine Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration auf einen basalen Wert dar und die Oszillationen verschwanden. Dieser am Versuchsende gemessene, basale Calciumwert lag dabei etwas über dem initialen intrazellulären Ausgangsniveau, was wahrscheinlich durch einen partiellen Fura-Efflux in Kompartimente mit hoher Calciumkonzentration, wie den intrazellulären Calciumspeichern oder dem extrazellulären Medium, zustande kommt.

In Vorversuchen (hier nicht gesondert dargestellt) war bezüglich verschiedener Glukosekonzentrationen von 3, 8, 11, 15 und 20mM gezeigt worden, dass eine Erhöhung der Glukosekonzentration von 3mM auf 11mM zu einem deutlichen, mittelgroßen Calciumanstieg führt, der noch ausreichend Raum für zusätzliche Calciumerhöhungen durch GLP-1 oder Forskolin bietet. So wurden alle weiteren Experimente mit diesen Glukosekonzentrationen ausgeführt.

3.1.4 Effekte von GLP-1 und Forskolin auf den intrazellulären Calciumspiegel der Langerhansschen Inseln am Fluoreszenzmikroskop

Wurde dem Superfusions-Standardpuffer zu den 11mM Glukose GLP-1 in einer Konzentration von 10^{-8} M zugefügt, kam es zu einer zusätzlichen Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration. Die Größe dieses Anstiegs war wie der Glukose-induzierte Anstieg (siehe Kapitel 3.1.3, Abbildung 3.5) sehr variabel und durch die

Oszillationen von seinem Ausmaß zum Teil schwierig zu beurteilen. So lag bei 11mM Glukose direkt vor der GLP-1-Zufuhr der Calciumspiegel bei $233\text{nM} \pm 94\text{nM}$ und unter 10^{-8}M GLP-1 maximal bei $364\text{nM} \pm 117\text{nM}$ (Mittelwert und Standardabweichung aus 8 Versuchen). Im weiteren wird wegen der großen Varianz der Calciumwerte der einzelnen Versuche die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung nicht durch die exakten Calciumwerte in nM angegeben. Vielmehr wurde bezüglich der GLP-1- und Forskolin-induzierten Effekte entsprechend der relative, prozentuale Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration gegenüber des Ausgangswertes bei alleiniger Superfusion von 11mM Glukose errechnet.

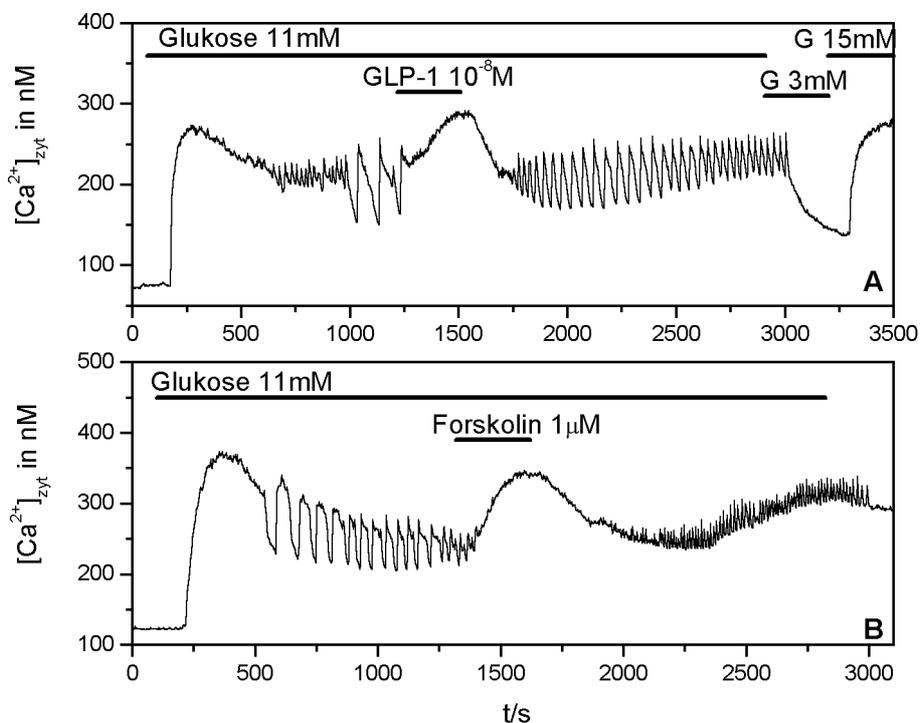


Abbildung 3.5: Exemplarische Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln **A** bei zusätzlicher Superfusion mit 10^{-8}M GLP-1 und **B** zusätzlicher Superfusion mit $1\mu\text{M}$ Forskolin. Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird 3mM Glukose zugefügt. (Exemplarisch für A 8, B 7 Versuche)

Im Vergleich zu dem Calciumwert bei 11mM Glukose stieg die zytosolische Calciumkonzentration durch Zugabe von 10^{-8}M GLP-1 um durchschnittlich $64\% \pm 35\%$ an (Mittelwert und Standardabweichung aus 8 Versuchen). Der Anstieg zeigte sich vor allem gegenüber der Basis der Oszillationen, wie in Abbildung 3.5A zu sehen. Trotz der

Unterschiede zwischen den einzelnen Inseln, war der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration durch GLP-1 in Relation zu den anderen Calciumspiegeln, wie zum Beispiel der Glukose-bedingten Erhöhung, relativ konstant. Nach Beendigung der GLP-1-Zufuhr senkte sich der zytosolische Calciumspiegel wieder ab, jedoch nicht immer auf das Ausgangsniveau, auf dem die Calciumkonzentration vorher bei 11mM Glukose lag.

Des Weiteren wurden immer auch Veränderung der Oszillationen beobachtet. Die Amplitude der Oszillationen wurde durch GLP-1 niedriger, vor allem durch einen Anstieg der Basis, die Frequenz erhöhte sich und die Dauer der einzelnen Oszillation wurde kleiner. Zum Teil waren die Veränderungen so ausgeprägt, dass die Oszillationen auf der Spitze der GLP-1-bedingten Calciumerhöhung vollständig unterbunden wurden. Nach Abschluss der GLP-1-Superfusion nahmen die Oszillationen in Amplitude wieder zu und die Frequenz erniedrigte sich, erreichte dabei aber nicht ganz die Ausgangsfrequenz.

Bei Versuchen mit 10^{-9} M GLP (nicht dargestellt) waren in diese Veränderungen weniger deutlich ausgeprägt, so dass die weiteren Versuche mit 10^{-8} M durchgeführt wurden.

Für Forskolin wurden dieselben Effekte wie für GLP-1 beobachtet (Abbildung 3.5B). Bei Konzentrationsreihen von 0,5, 1 und 5 μ M Forskolin (nicht einzeln dargestellt), zeigten sich bei 1 μ M eine maximale Wirkung, so dass im folgenden alle Experimente an Langerhansschen Inseln mit dieser Konzentration ausgeführt wurden. Wurde zu den 11mM Glukose 1 μ M Forskolin hinzugefügt, erhöhte sich die intrazelluläre Calciumkonzentration um durchschnittlich $69\% \pm 25\%$ an, bzw. stieg die Calciumkonzentration von $212\text{nM} \pm 34\text{nM}$ unter 11mM Glukose auf maximal $353\text{nM} \pm 31\text{nM}$ durch 1 μ M Forskolin an (Mittelwert und Standardabweichung aus 7 Versuchen).

Um die Effekte von GLP-1 und Forskolin gut abgrenzen zu können, wurde die Superfusion mit diesen Substanzen kurz gehalten und nach Erreichen des Maximums beendet.

3.2 Wirkung verschiedener selektiver Proteinkinase A Hemmstoffe auf die GLP-1- und Forskolin-induzierten Effekte an INS-1-Zellen und Langerhansschen Inseln

Nachdem die Reaktion der INS-1-Zellen und β -Zellen der Langerhansschen Inseln der Maus auf GLP-1 und Forskolin untersucht worden war, wurden nun die Beteiligung verschiedener Proteinkinasen an der Signaltransduktion dieser Substanzen analysiert. Um zu identifizieren inwieweit die cAMP-abhängigen Proteinkinase A an der Signaltransduktion von GLP-1 in β -Zellen des Pankreas beteiligt ist, wurde zuerst die Wirkung spezifischer Hemmstoffe der cAMP-abhängigen Proteinkinase A auf die GLP-1- und Forskolin-induzierte Antwort der INS-1-Zellen und Langerhansschen Inseln untersucht. Hierzu wurden als Inhibitoren KT5270, Rp-cAMPs, und H-89 verwendet.

3.2.1 Messungen mit KT5270 als Hemmstoff der Proteinkinase A

Zunächst wurde die Auswirkung von KT5270 auf Forskolin in Messungen der zytosolischen Calciumkonzentration der INS-1-Zellen mit Fura-2 am Fluoreszenzspektrometer untersucht. Abbildung 3.6 zeigt den durch Forskolin ausgelösten zytosolischen Calciumanstieg in Abhängigkeit von der vorher zugeführten KT5270-Konzentration. Der Anstieg auf 5 μ M Forskolin lag in der Kontrollgruppe bei 90nM \pm 23nM, nach 15-minütiger Inkubation mit 2 μ M KT5270 bei 94nM \pm 12nM und blieb auch bei höheren KT5270-Konzentrationen unverändert groß. So erhöhte sich der intrazelluläre Calciumspiegel nach Inkubation mit 5 μ M KT5270 um 88nM \pm 4nM und bei 10 μ M um 98nM (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 1-3 Experimente). KT5270 hatte somit keinen Einfluss auf den Forskolin-induzierten Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration bei den INS-1-Zellen.

In den Messungen des Membranpotentials der INS-1-Zellen mit Bisoxonol am Fluoreszenzspektrometer führte die Zugabe von 5 μ M Forskolin, am Beginn dieses Kapitels (Kap. 3.1.2) bereits dargestellt, zu einer deutlichen, raschen und dann plateauförmigen Depolarisation. Wie beispielhaft aus Abbildung 3.7 ersichtlich ist, blieb diese Forskolin-induzierte Depolarisation auch nach Inkubation mit 5 μ M KT5270 für 15 Minuten unbeeinflusst (exemplarisch für 2 Versuche).

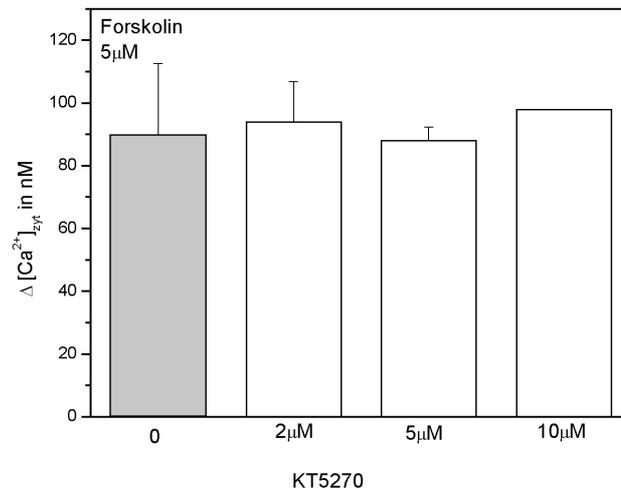


Abbildung 3.6: Darstellung der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($\Delta [Ca^{2+}]_{int}$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von $5\mu M$ Forskolin in Abhängigkeit von der vorherigen Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von KT5270. Inkubationszeit 15 Minuten. (Mittelwerte bei 0-5 μM aus 3 Messungen, bei 10 μM Einzelmessung)

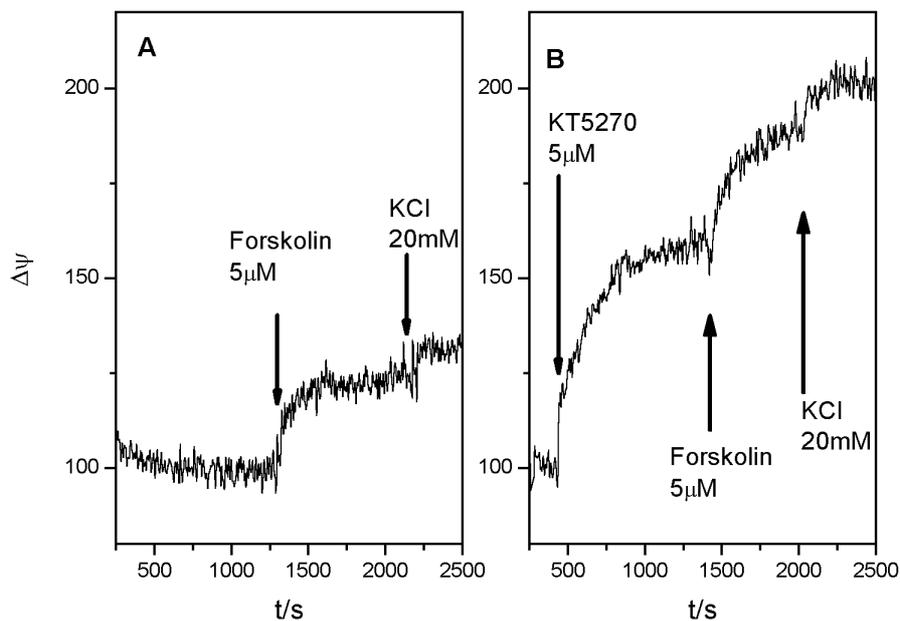


Abbildung 3.7: Darstellung von Änderungen des Membranpotentials ($\Delta\psi$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von $5\mu M$ Forskolin. **A** als Kontrolle. Bei **B** nach 15 minütiger Inkubation mit $5\mu M$ KT5270.

Als Vergleichsgröße für Membranpotentialänderungen gilt die Depolarisation der Zellmembran nach Zugabe von 20mM KCl. (Exemplarisch für 2 Versuche)

Neben den INS-1-Zellen wurde auch die Reaktion der Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln untersucht. Superfusion der Inseln mit verschiedenen Konzentrationen KT5720 alleinig zu 11mM Glukose zeigte keine eindeutig reproduzierbare Änderung des Verhaltens der Inseln in Bezug auf die Höhe der zytosolischen Calciumkonzentration(nicht gesondert dargestellt), die Größe der Oszillationen nahm jedoch leicht ab (Abbildung 3.8).

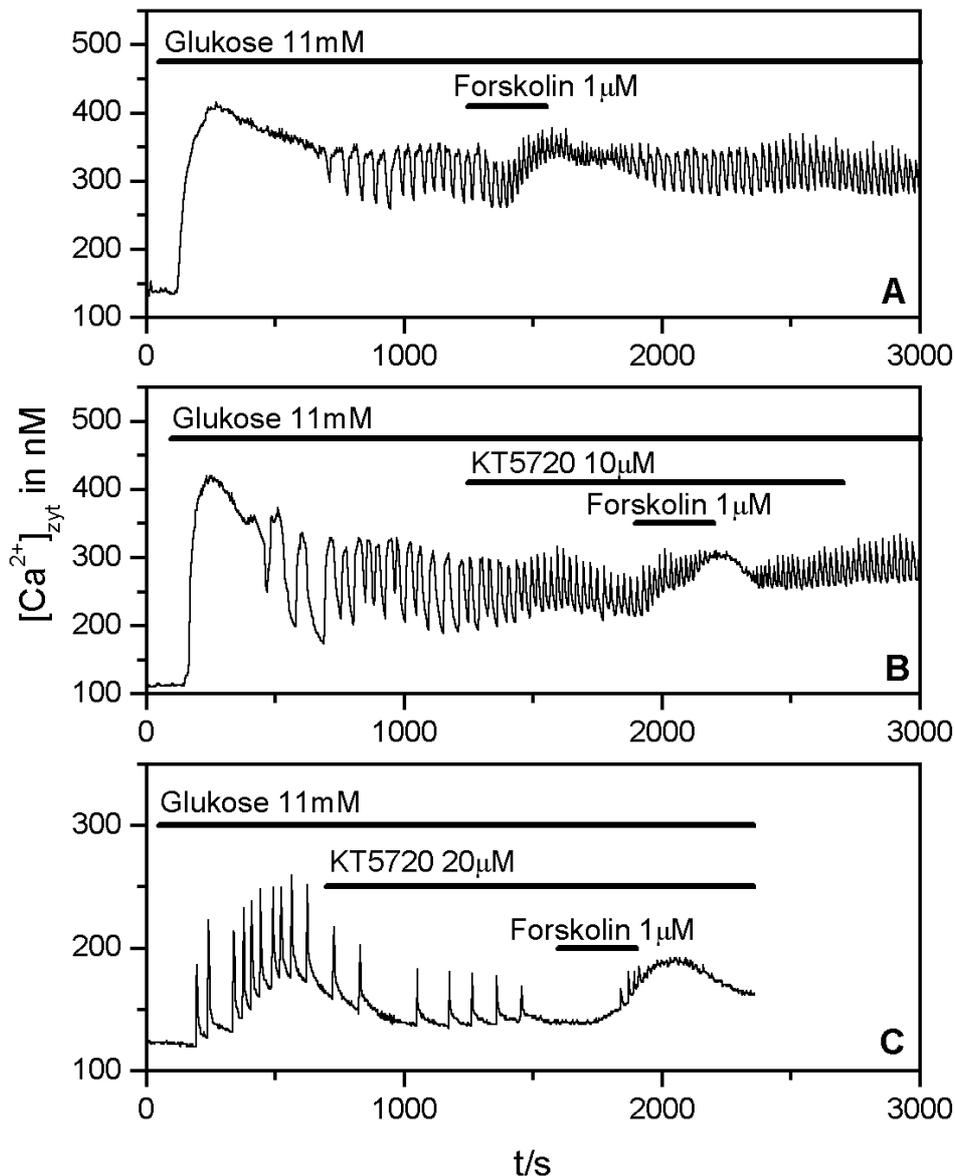


Abbildung 3.8: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln. **A** als Kontrolle bei Superfusion mit $10^{-8}M$ GLP-1. Bei **B** zusätzliche Superfusion mit $10\mu M$ KT5720, bei **C** mit $20\mu M$ KT5720. Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird 3mM Glukose zugefügt.

1 μ M Forskolin hatte bei dieser Glukosekonzentration zu einer konstant reproduzierbaren Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels um durchschnittlich 69% \pm 25% geführt (siehe Kapitel 3.1.4). Nach Vorinkubation mit 10 und 20 μ M KT5270 für 10 bis 15 Minuten lag diese Forskolin-bedingte Erhöhung zwischen 35% und 40% (Abbildung 3.8). Entsprechend der deutlichen Streuung der Kontrolle fand sich hier insgesamt keine eindeutige hemmende Wirkung von KT5720 auf den Forskolin-Effekt, zumal sich proportional zu den Forskolin-bedingten Veränderungen auch die Glukose-induzierten Effekte, wie Größe der Oszillationen, durch KT5720 verkleinerten.

3.2.2 Messungen mit Rp-cAMPs als Hemmstoff der Proteinkinase A

Neben KT5720 wurde Rp-cAMPs verwendet, welches als inaktives Analog von cAMP die cAMP-abhängige Proteinkinase A hemmt. Bei den Messungen der intrazellulären Calciumspiegel der INS-1-Zellen am Fluoreszenzspektrometer bewirkte Rp-cAMPs selbst keine Änderung der Calciumwerte, so dass auf die Darstellung der ursprünglichen Kurve im Bereich der Rp-cAMPs-Zufuhr verzichtet wurde. Ebenso wie für KT5720 zeigte Rp-cAMPs keine Inhibition der Forskolin-induzierten Calciumerhöhung (siehe Abbildung 3.9). So befand sich der Calciumanstieg durch 5 μ M Forskolin ohne Rp-cAMPs bei 90nM \pm 23nM und nach Inkubation mit Rp-cAMPs 1mM für 15-20 Minuten bei 97 \pm 23nM (Mittelwert und Standardabweichung aus 2 Experimenten).

Die fehlende Wirkung von Rp-cAMPs auf den Forskolin-Effekt ließ sich durch die Membranpotentialmessung der INS-1-Zellen mit Bisoxonol am Fluoreszenzspektrometer bestätigen. Wie beispielhaft aus Abbildung 3.10 ersichtlich, blieb die durch 5 μ M Forskolin ausgelöste rasche Depolarisation auch nach Vorinkubation der INS-1-Zellen mit 200 μ M Rp-cAMPs für 30min unverändert bestehen.

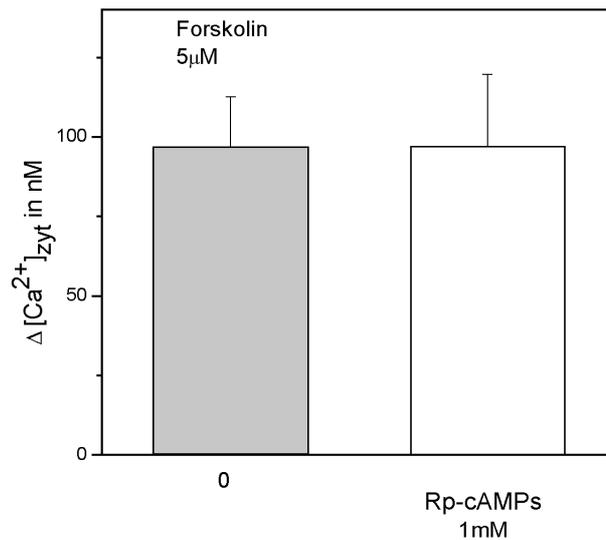


Abbildung 3.9: Darstellung der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von $5\mu\text{M}$ Forskolin in Abhängigkeit von der vorherigen Inkubation der Zellen mit 1mM Rp-cAMPs. Inkubationszeit 15 Minuten. (Mittelwerte aus 2 Messungen)

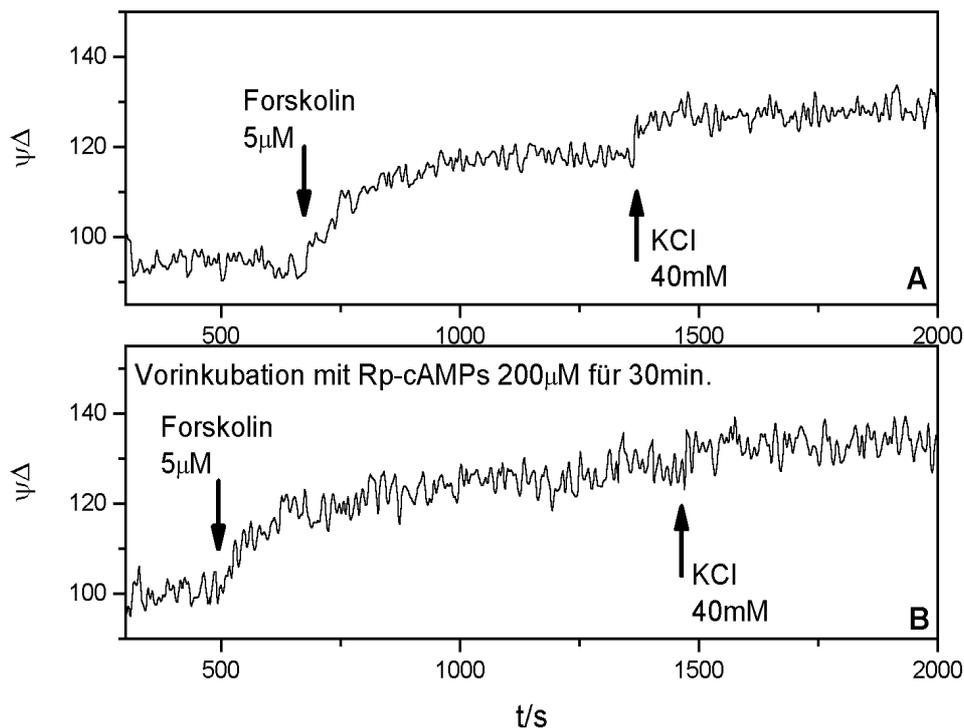


Abbildung 3.10: Darstellung von Änderungen des Membranpotentials ($\Delta\psi$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von $5\mu\text{M}$ Forskolin. **A** als Kontrolle. Bei **B** nach vorheriger 35-minütiger Inkubation mit $200\mu\text{M}$ Rp-cAMPs. Als Vergleichsgröße für Membranpotentialänderungen gilt die Depolarisation der Zellmembran nach Zugabe von 40mM KCl.

Für die Beurteilung der Wirkung von Rp-cAMPs wurden des weiteren Messungen der intrazellulären Calciumspiegel von β -Zellen der Langerhansschen Inseln mit Fura-2 am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Initial wurden dabei die Veränderungen der Oszillationen durch Rp-cAMPs selbst bei 11mM Glukose aufgezeichnet. Rp-cAMPs führte in hohen Konzentrationen, wie in Abbildung 3.11 exemplarisch mit 3mM dargestellt, zu einer Verringerung der Amplitude dieser Oszillationen. Die durchschnittliche zytosolische Calciumkonzentration der β -Zellen blieb auf einem stabilen Niveau.

Neben dem Einfluss von Rp-cAMPs auf die Glukose-induzierten Oszillationen wurde die Auswirkung auf die durch GLP-1-bedingte Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels bewertet. 10^{-8} M GLP-1 hatte bei 11mM Glukose zu einem prozentualen Anstieg der Calciumkonzentration um $64\% \pm 35\%$ geführt (Kapitel 3.1.4). Nach Superfusion der Langerhansschen Insel mit 500μ M Rp-cAMPs für 5min zeigte sich, hier beispielhaft in Abbildung 3.12 aufgeführt, ein deutlicher Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration durch 10^{-8} M GLP-1 um 43%, der in Anbetracht der hohen Streuung der Kontrollgruppe keiner Inhibition entsprach.

Auch die Forskolin-bedingte Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration wurde durch Rp-cAMPs nicht verändert. Aus Abbildung 3.13 ist ersichtlich, dass sowohl trotz einer Vorinkubation mit 100μ M (15min) als auch mit 500μ M Rp-cAMPs für 5min ein deutlicher Forskolin-induzierter Calciumanstieg von 73% bzw 91% nachweisbar war. Diese Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels lag somit im Bereich der Kontrollmessungen, bei der 5μ M Forskolin zu einem Anstieg um $69\% \pm 25\%$ geführt hatte (Kapitel 3.1.4).

Um auszuschließen, dass sich der fehlende Effekt von Rp-cAMPs infolge einer mangelnden Konzentration oder Penetration durch die Zellmembran ergeben hatte, wurden Experimente mit dem aktiven Diastereomer Sp-cAMPs in ähnlichen Konzentrationen unternommen. Aus Abbildung 3.14 geht hervor, dass Sp-cAMPs in einer Konzentration von 500μ M mit einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (20% im abgebildeten Beispiel) einhergeht, der zirka 160sec nach Initiierung der Superfusion beginnt und nach dessen Beendigung rasch wieder auf das Ausgangsniveau ab fiel. Sp-cAMPs hatte somit bei einer Konzentration von 500μ M schnell zu einer Beeinflussung der Beta-Zelle geführt.

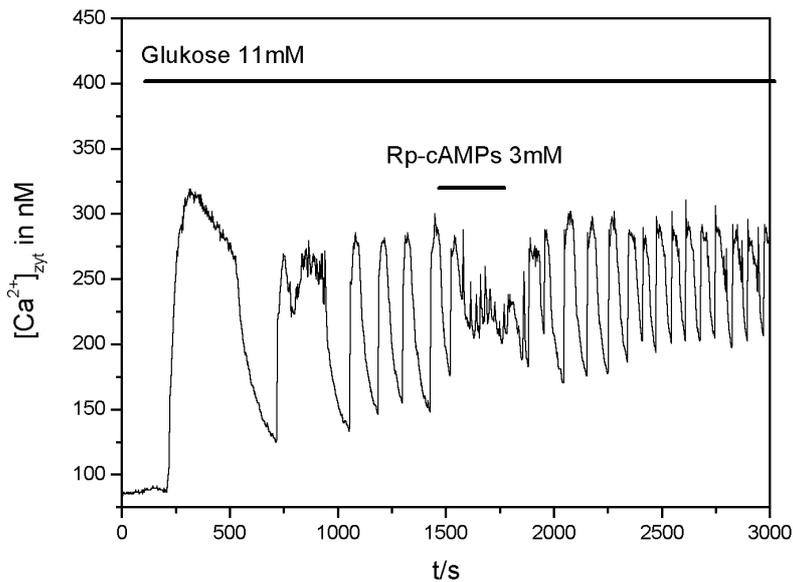


Abbildung 3.11: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln bei Superfusion 3mM Rp-cAMPs. Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird 3mM Glukose zugefügt.

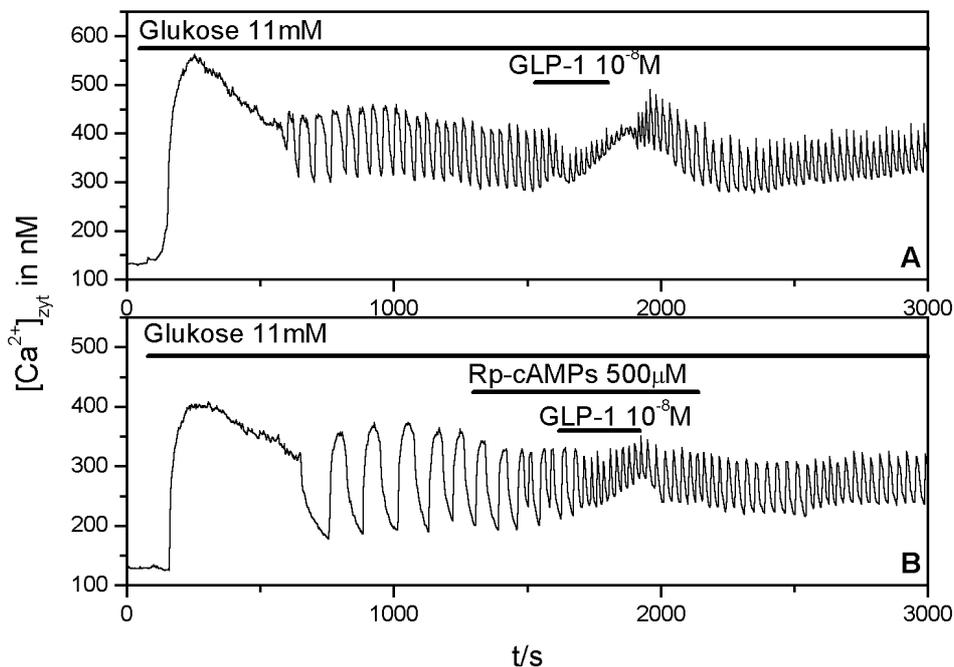


Abbildung 3.12: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln. **A** als Kontrolle bei Superfusion mit $10^{-8}M$ GLP-1. Bei **B** zusätzliche Superfusion mit $500\mu M$ Rp-cAMPs.

Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird 3mM Glukose zugefügt.

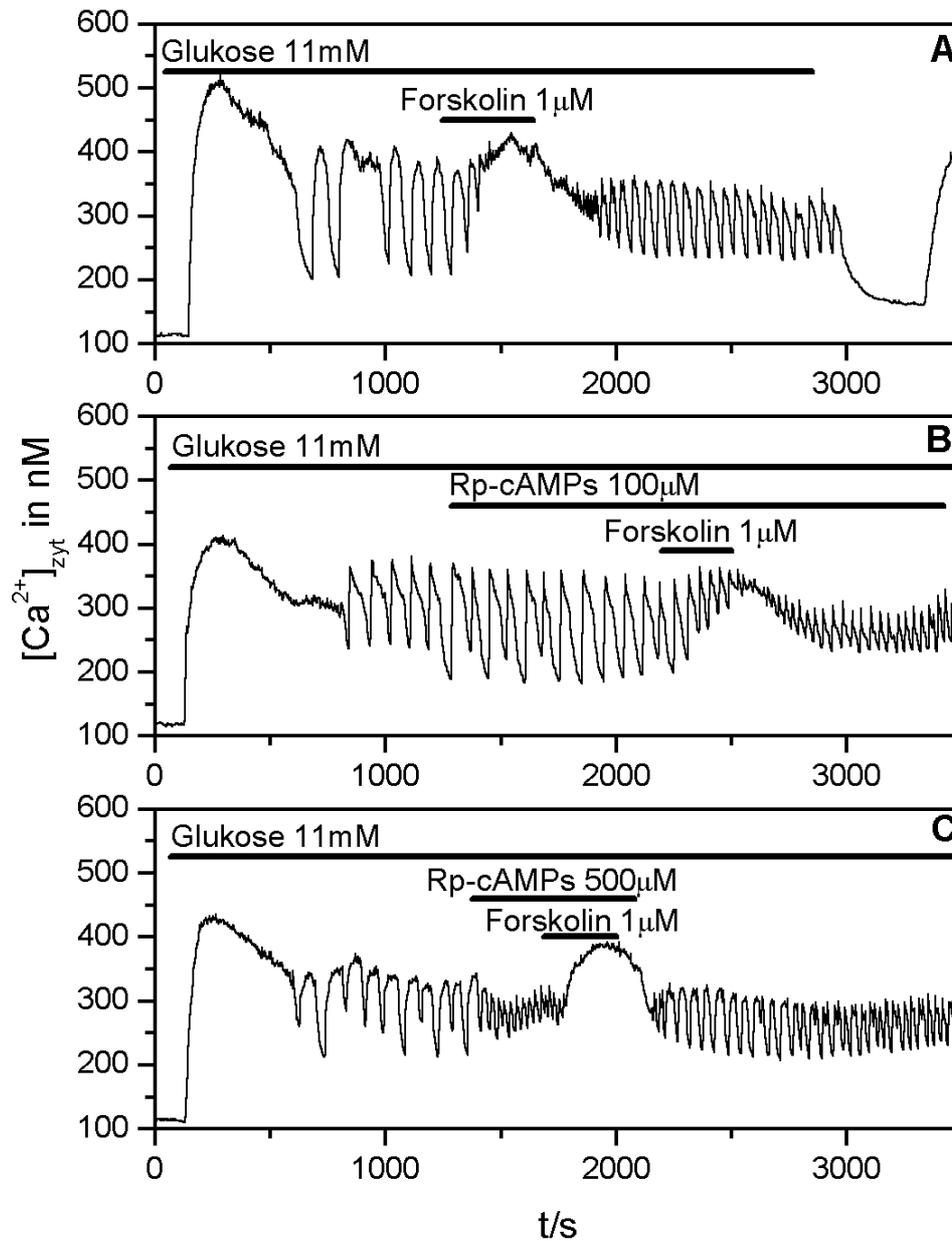


Abbildung 3.13: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln. **A** als Kontrolle bei Superfusion mit $1\mu M$ Forskolin. Bei **B** zusätzliche Superfusion mit $100\mu M$ Rp-cAMPs, bei **C** mit $500\mu M$ Rp-cAMPs. Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird $3mM$ Glukose zugefügt. (Exemplarisch für 2 Versuche)

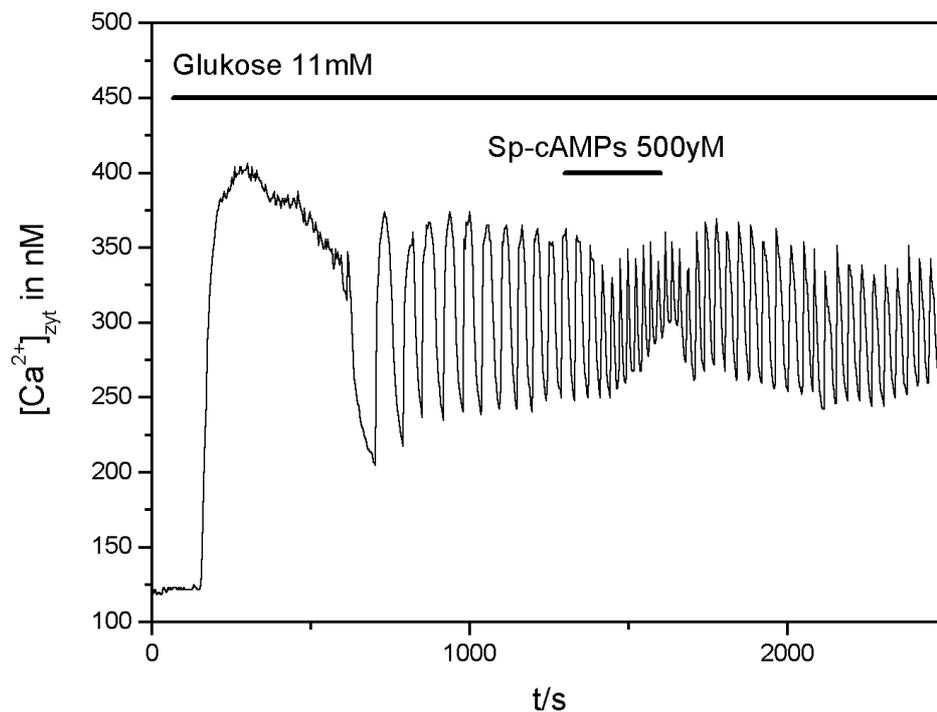


Abbildung 3.14: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln bei Superfusion mit $500\mu M$ Sp-cAMPs. Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird $3mM$ Glukose zugefügt.

Wird zusätzlich zu Sp-cAMP noch GLP-1 oder Forskolin hinzu gegeben, erhöhte sich die zytosolische Calciumkonzentration weiter (Abbildung 3.15). Das genaue Ausmaß dieses Anstiegs ist allerdings wegen Überschneidungen der beiden agonistischen Effekte schlecht abgrenzbar, so dass hier die prozentualen Höhen nur sehr ungenau angegeben werden können. Beispielhaft führte $250\mu M$ Sp-cAMPs zu einem Anstieg um 7% (Abbildung 3.15C) bzw. 14% (Abbildung 3.15D). $10^{-8}M$ GLP-1 konnte den Calciumspiegel um 9% bzw. $1\mu M$ Forskolin um 26% weiter erhöhen.

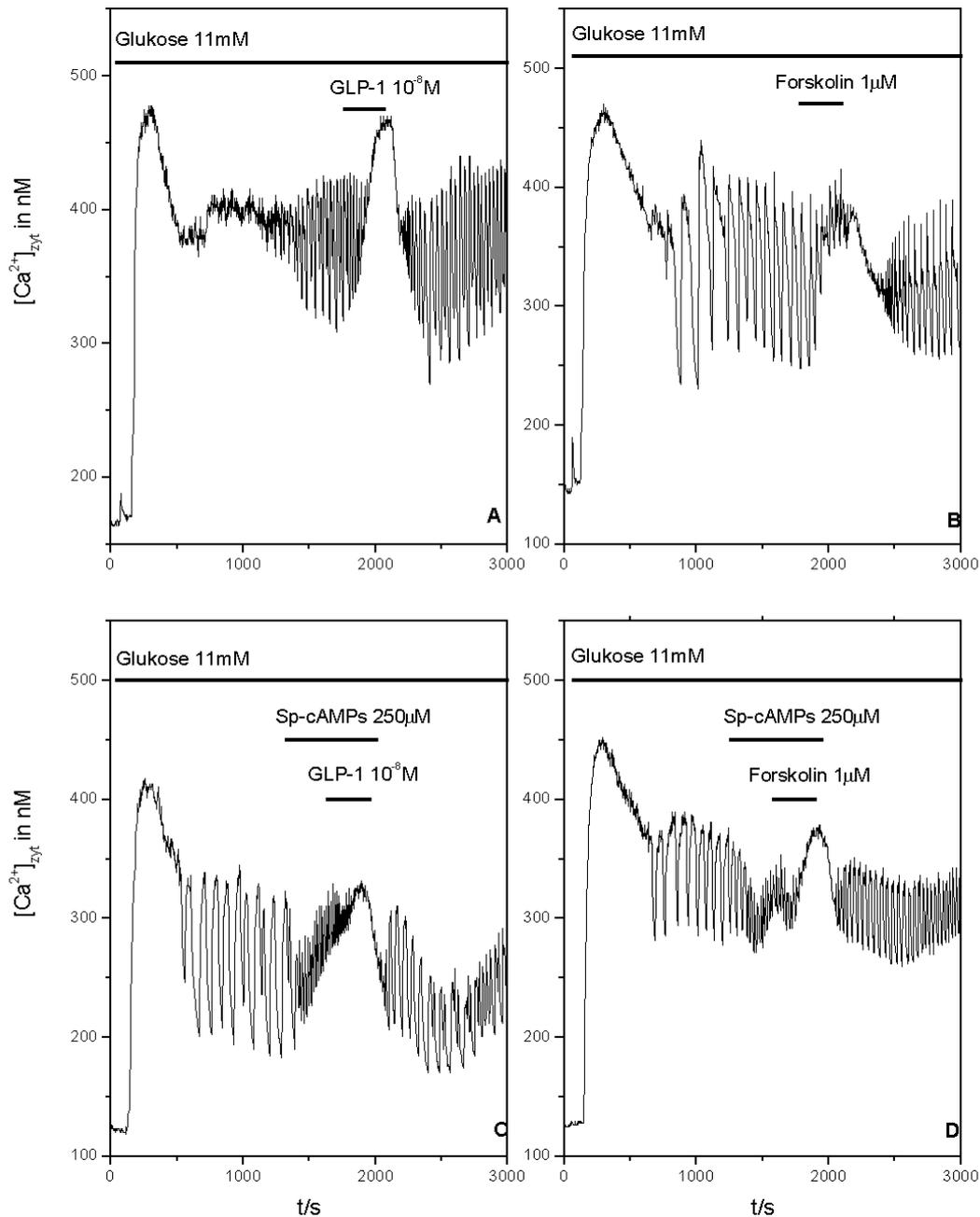


Abbildung 3.15: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln. **A** als Kontrolle bei Superfusion mit $10^{-8}M$ GLP-1 und **B** als Kontrolle mit $1\mu M$ Forskolin. Bei **C** und **D** zusätzliche Superfusion mit $250\mu M$ Sp-cAMPs.

Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird 3mM Glukose zugefügt.

3.2.3 Messungen mit H-89 als Hemmstoff der Proteinkinase A

Nach KT5720 und Rp-cAMPs wurde mit H-89 ein dritter spezifischer Hemmstoff der Proteinkinase A verwendet. Bei der Messung der zytosolischen Calciumkonzentration der INS-1-Zellen am Fluoreszenzspektrometer führte die Zugabe von H-89, wie in Abbildung 3.16 beispielhaft im Zeitverlauf dargestellt, zu einem prompten Absinken der gemessenen intrazellulären Calciumkonzentration auf ein niedrigeres Niveau, auf dem die Calciumwerte nachfolgen konstant blieben. Die Größe dieser Absenkung hing von der jeweiligen H-89-Konzentration ab und lag, wie bei dem hier abgebildeten Versuch bei 25nM, während sie bei 20µM H-89 zum Beispiel zwischen 40 und 60nM lag (Werte aus je 2 Versuchen).

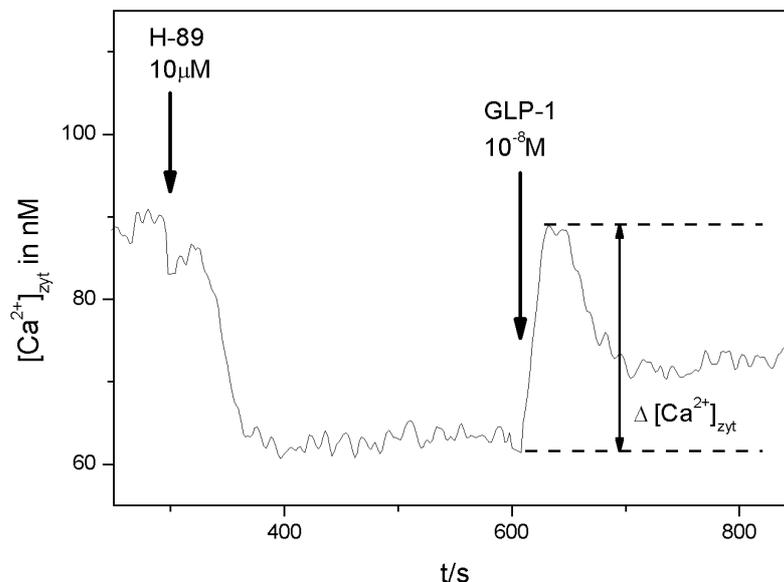


Abbildung 3.16: Beispieldarstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von $10\mu M$ H-89 und nachfolgend $10^{-8}M$ GLP-1.

Wurde den mit H-89 inkubierten INS-1-Zellen GLP-1 hinzugefügt, verringerte sich die GLP-1-induzierte Erhöhung der zytosolischen Calciumspiegel in Abhängigkeit von der H-89-Konzentration (Abbildung 3.17). So stieg das intrazelluläre Calcium in der Kontrollgruppe durch $10^{-8}M$ GLP-1 um $62nM \pm 24nM$ an, während dieser Anstieg bei Vorinkubation mit $2\mu M$ H-89 bei $40nM \pm 9nM$, bei $5\mu M$ H-89 $33nM \pm 5nM$ betrug. Unter $10\mu M$ H-89 bewirkte $10^{-8}M$ GLP-1 nur noch eine Erhöhung um $24nM \pm 3nM$ und schließlich bei $20\mu M$ H-89 um $7nM \pm 3nM$ (Mittelwerte und Standardabweichungen

aus je 2-4 Versuchen). Eine Verlängerung der Inkubationszeit von 5 auf 30 Minuten zeigte dabei keine weitere Verstärkung des inhibitorischen Effekts des H-89.

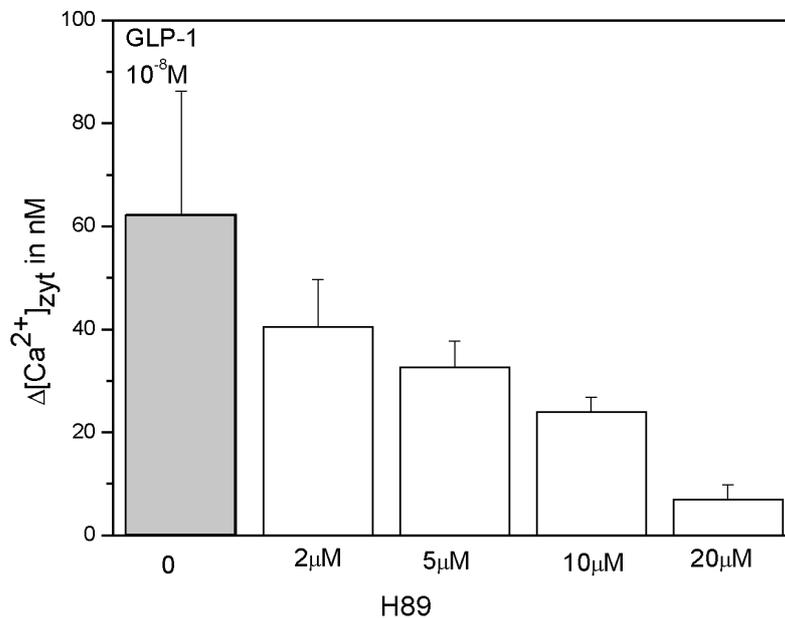


Abbildung 3.17: Darstellung der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($\Delta [Ca^{2+}]_{zyt}$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von $10^{-8}M$ GLP-1 in Abhängigkeit von der vorherigen Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von H-89. Inkubationszeit zwischen 5 und 30 Minuten. (Mittelwerte aus 2-4 Messungen)

Bei der Messung des Membranpotentials der INS-1-Zellen mit Bisoxonol am Fluoreszenzspektrometer wurde erkennbar, dass die deutliche Depolarisation bei Zugabe von $5\mu M$ Forskolin durch vorheriger Inkubation mit $10\mu M$ H-89 stark reduziert wurde, wie unter 3.18 abgebildet. Dieser Versuch steht exemplarisch für 2 weitere Versuche mit dem selben Ergebnis.

Nachdem sich bei den INS-1-Zellen somit einen Reduktion der GLP-1- und Forskolin-bedingten Effekte durch den spezifischen Proteinkinase A-Hemmstoff H-89 dargestellt hatte, wurde überprüft, ob sich diese Befunde bei den β -Zellen der Langerhansschen Inseln der Maus bestätigen ließen.

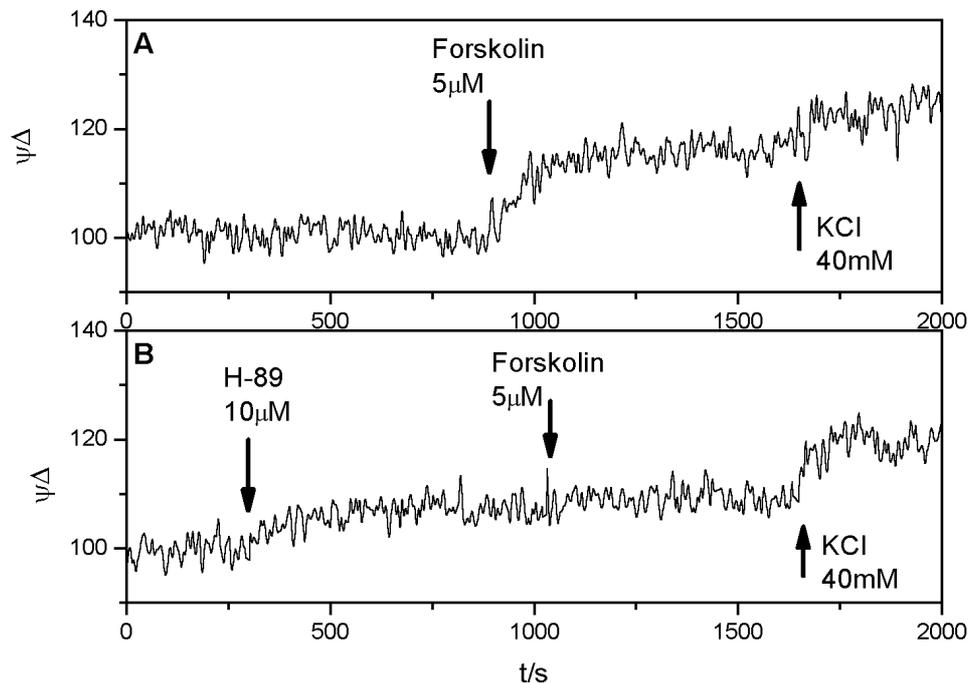


Abbildung 3.18: Darstellung von Änderungen des Membranpotentials ($\Delta\psi$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von 5 μM Forskolin. **A** als Kontrolle. Bei **B** Zugabe von 10 μM H-89 10 Minuten vor dem Forskolin.

Als Vergleichsgröße für Membranpotentialänderungen gilt die Depolarisation der Zellmembran nach Zugabe von 40 mM KCl. (Exemplarisch für 2 Versuche)

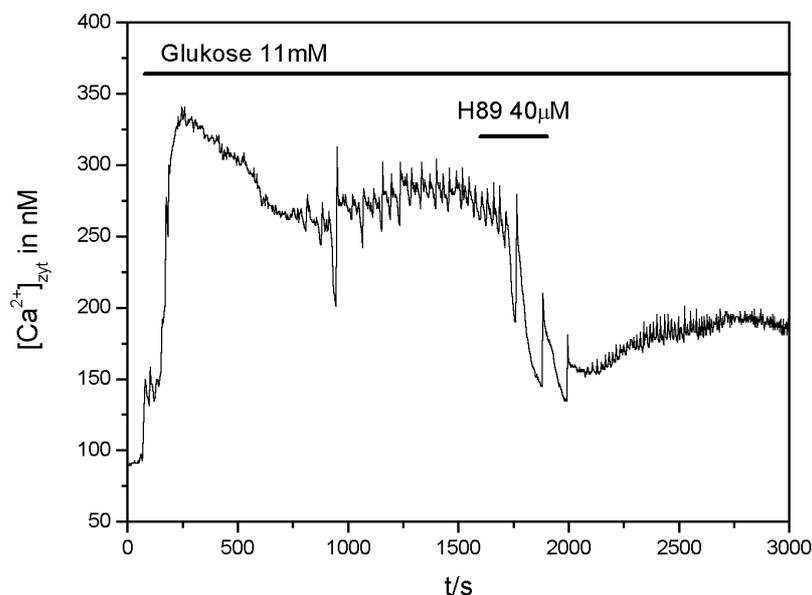


Abbildung 3.19: Exemplarische Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$) der β -Zellen der Langerhansschen Insel bei Superfusion von 40 μM H-89.

Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird 3 mM Glukose zugefügt.

Hierzu wurde zunächst der Einfluss von H-89 selbst auf die β -Zellen bei 11mM Glukose untersucht. In Abbildung 3.19 sowie 3.20-21 ist erkennbar, dass H-89 zu einem Abfall der zytosolischen Calciumkonzentration führte, der wiederum von der Höhe des H-89-Konzentration in der Superfusionslösung abhängig war. Des weiteren reduzierte H-89 die Größe der Glukose-induzierten Oszillationen. Ein Einfluss auf die Frequenz der Oszillationen war nicht sicher abzugrenzen. Bei einer Inkubation der Inseln mit 40 μ M H-89 bei 3mM Glukose wurde der Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration auf 11mM Glukose stark reduziert und die Oszillationen bei längerer Inkubation vollständig unterdrückt. Ohne weitere beeinflussende Substanzen lag der Anstieg des zytosolischen Calciums bei Erhöhung der Glukosesuperfusion von 3 auf 11mM, wie oben beschrieben (Kapitel 3.1.3), bei durchschnittlich 280nM. Bei vorheriger Gabe von 40 μ M H-89 stieg der Calciumspiegel von im Mittel 141nM \pm 12nM auf 185nM \pm 20nM, das heißt also um ca. 44nM an und betrug somit nur noch ca. 15% des ursprünglichen Anstiegs (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Versuchen).

Weiterhin wurde die Auswirkung von H-89 auf die GLP-1-induzierten Veränderungen beobachtet. Aus Abbildung 3.20 ist ersichtlich, dass die Calciumerhöhung, die durch GLP-1 ausgelöst worden war, durch H-89 reduziert wurde. Im Gegensatz zur Kontrolle, bei der 10⁻⁸M GLP-1 zu einer prozentualen intrazellulären Calciumerhöhung um 64% \pm 35% geführt hatte, lösten 10⁻⁸M GLP-1 in dieser Versuchsreihe nach einer kurze Superfusion mit 20 μ M H-89 einen Anstieg um 28%, mit 40 μ M H-89 um 35% aus. Nach 40minütige Inkubation mit 40 μ M H-89 lag die GLP-1-induzierte Calciumerhöhung prozentual bei 7% und betrug somit noch ca. 11% des ursprünglichen Effektes, was in etwa der Reduktion entsprach, die H-89 bei der Glukose-induzierten Calciumerhöhung bewirkt.

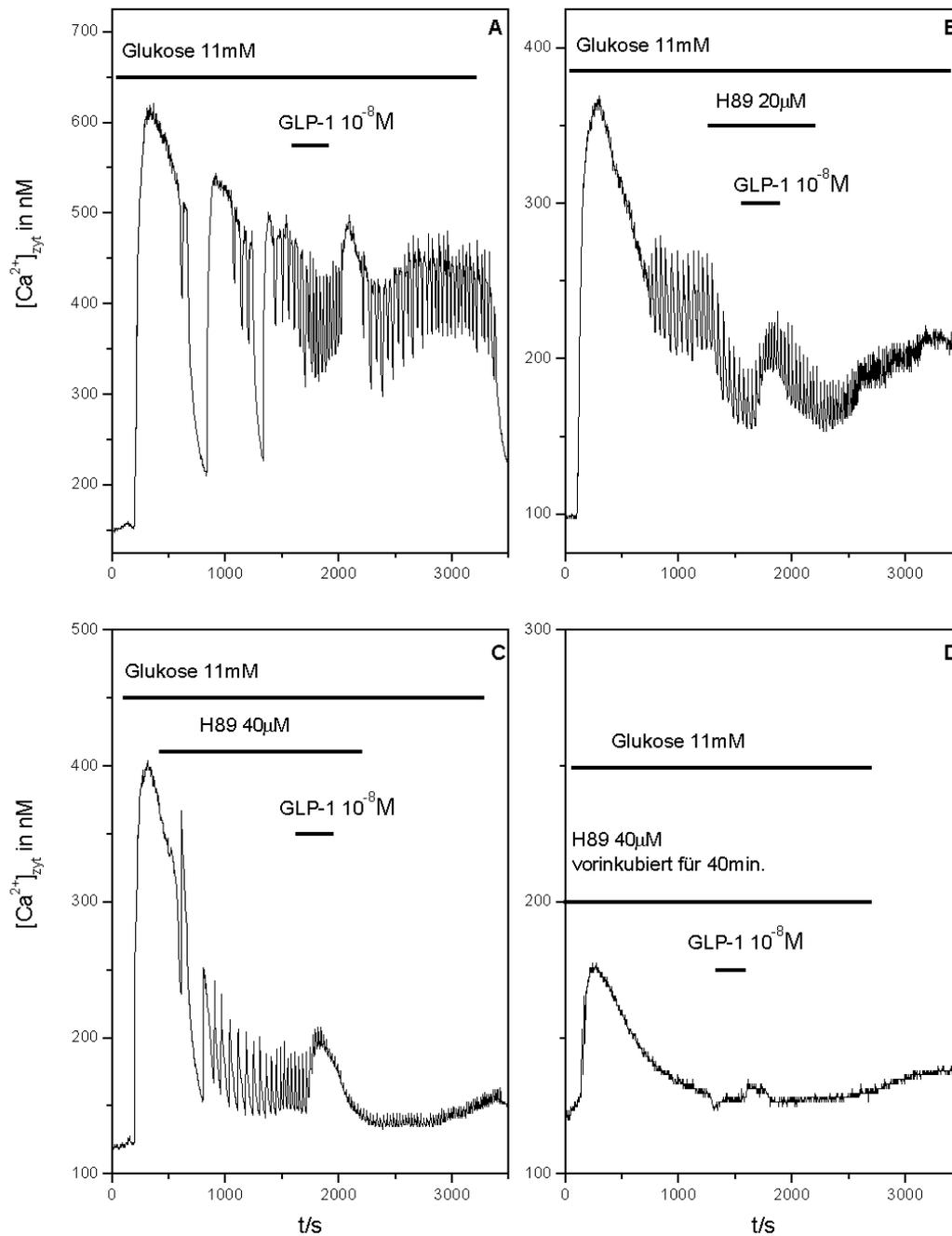


Abbildung 3.20: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln. **A** als Kontrolle bei Superfusion mit $10^{-8} M$ GLP-1. Bei **B** zusätzliche Superfusion mit $20 \mu M$ H-89, bei **C** mit $40 \mu M$ H-89, bei **D** mit vorheriger Inkubation der Insel mit $40 \mu M$ H-89 für 40 Minuten.

Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird $3mM$ Glukose zugefügt.

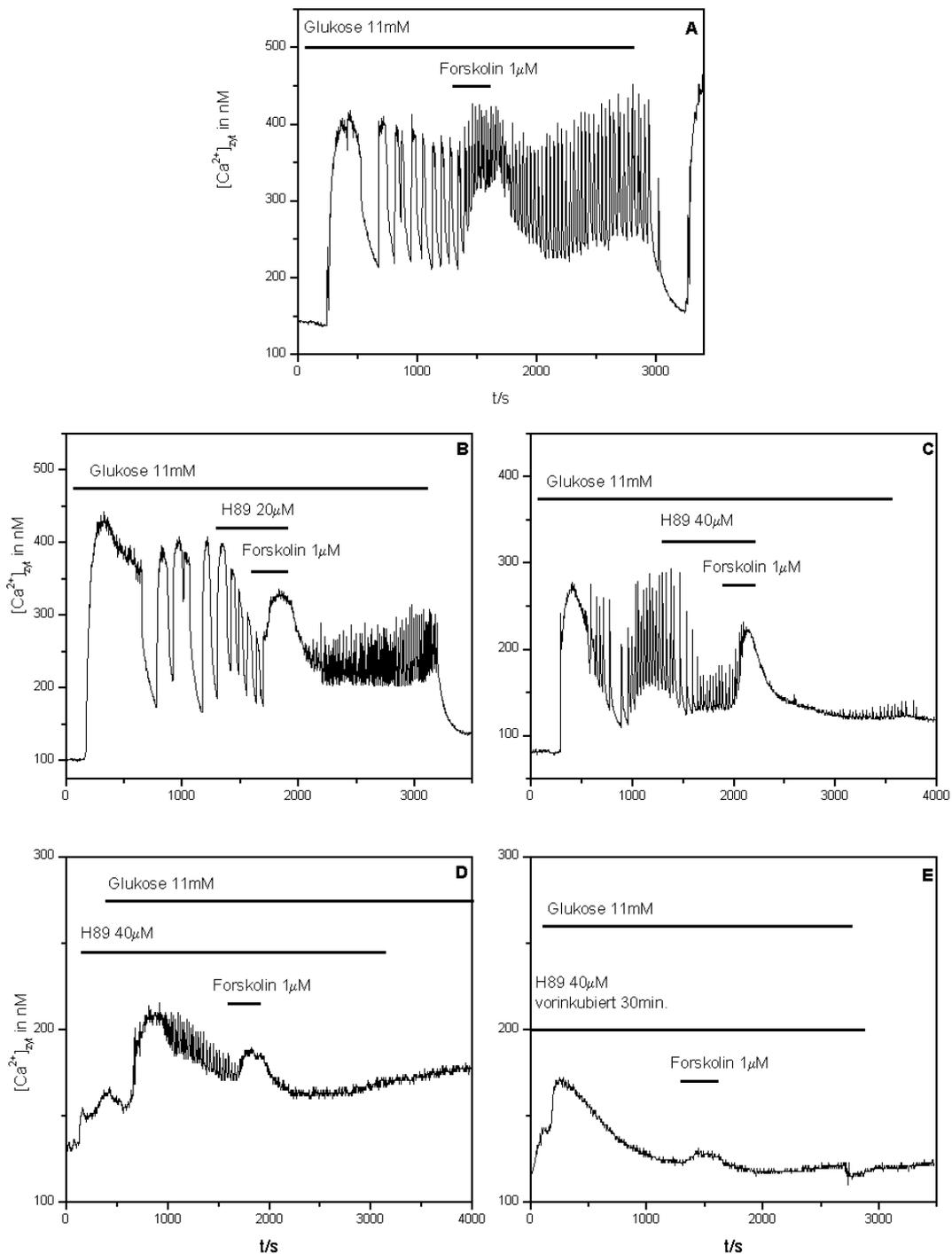


Abbildung 3.21: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln. **A** als Kontrolle bei Superfusion mit $1\mu M$ Forskolin. Bei **B** zusätzliche Superfusion mit $20\mu M$ H-89, bei **C** mit $40\mu M$ H-89, bei **D** Superfusion von $40\mu M$ H-89 schon bei $3mM$ Glukose, bei **E** mit vorheriger Inkubation der Insel mit $40\mu M$ H-89 für 30 Minuten.

Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einen Balken angegeben ist, wird $3mM$ Glukose zugefügt.

Einen ähnliche Beeinflussung fand sich beim Forskolin-induzierten intrazellulären Calciumanstiegs (Abbildung 3.21) Aus den 5 beispielhaft dargestellten Versuche ist erkennbar, dass für die Inhibition von Forskolin hohe H-89-Spiegel und lange Inkubationszeiten erforderlich sind. Das Balkendiagramm 3.22 stellt die Abnahme der Höhe der intrazellulären Calciumkonzentration dar, die 1 μ M Forskolin auslöste, in Abhängigkeit von der anwesenden H-89-Konzentration. Die in der Kontrollgruppe erzielte Erhöhung von 69% \pm 25%, ausgehend vom basalen Calciumwert bei 11mM Glukose, lag bei 20 μ M H-89 bei 86%. Bei kurzer Inkubationszeit von um 5-10min mit 40 μ M H-89 bewirkte Forskolin einen Calciumanstieg von 50% \pm 15%. Bei Superfusion der Inseln für 30-40min mit dieser Konzentration führte Forskolin zu einer Erhöhung des Calciumspiegels um 8% \pm 4%. Dieser Anstieg betrug somit noch ca. 11% im Vergleich zur Gruppe.

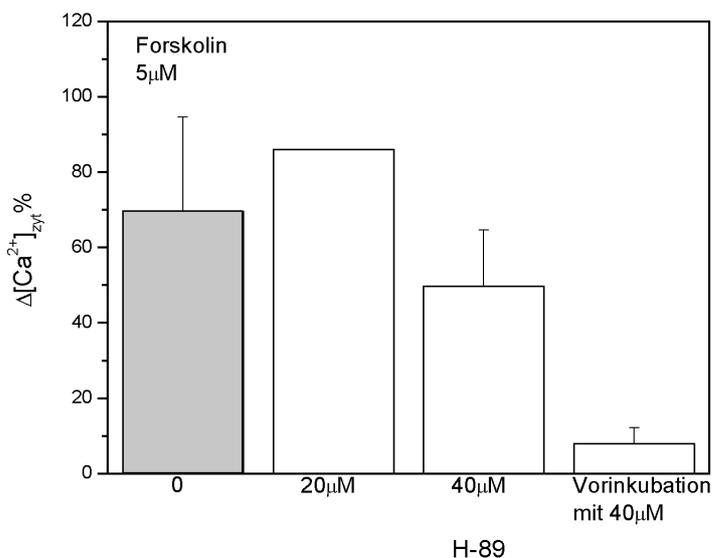


Abbildung 3.22: Darstellung der prozentualen Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($\Delta [Ca^{2+}]_{zyt}\%$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln ausgehend von der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ unter 11mM Glukose. Zunahme bei 1 μ M Forskolin in Abhängigkeit von der vorherigen Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von H-89. Inkubationszeit wenn nicht angegeben 5 bis 10 Minuten. (Mittelwerte aus 2-3 Messungen, nur bei 20 μ M Einzelmessung)

Insgesamt reduzierte H-89 die Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration durch 11mM Glukose auf 15% gegenüber der Kontrolle, die durch GLP-1 und Forskolin auf ca. 11%. Die Hemmung der Glukose-induzierten Effekte durch H-89 erschien mit der des GLP-1- und Forskolin-vermittelten Calciumanstiegs genau parallel.

3.3 Untersuchung verschiedener selektiver Tyrosinkinase-Hemmstoffe auf die GLP-1- und Forskolin-bedingten Effekte an INS-1-Zellen und Langerhansschen Inseln

Es wurden neben der cAMP-abhängigen Proteinkinase A auch die Beteiligung von Tyrosinkinasen an der Signaltransduktion von GLP-1 und Forskolin untersucht. Dabei wurden die Auswirkungen spezifischer Hemmstoffe für Tyrosinkinasen ermittelt. Hierzu wurden Genistein und Herbimycin A benutzt.

3.3.1 Messungen mit Genistein als Hemmstoff der Tyrosinkinasen

Zunächst wurden die Einflüsse von Genistein auf den zytosolischen Calciumspiegel der INS-1-Zellen am Fluoreszenzspektrometer beobachtet. Genistein selbst führte direkt zu einem sehr starken Abfall der gemessenen intrazellulären Calciumkonzentration auf ein niedrigeres Niveau, die für die weitere Versuchsdauer die Basis der Calciumwerte blieb. Exemplarisch wird dies in Abbildung 3.23 dargestellt. In diesem Versuch wurde die gemessene Calciumkonzentration durch die Anwesenheit von 5 μ M Genistein von 192 nM auf 118 nM gesenkt. Bei höheren Genisteinkonzentrationen vergrößerte sich dieser Abfall.

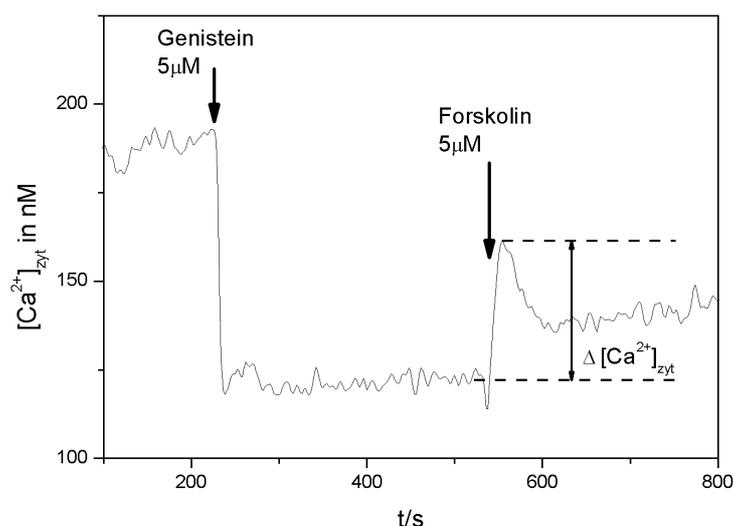


Abbildung 3.23: Beispieldarstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von zunächst 5 μ M Genistein und 5 μ M Forskolin.

Genistein hatte ebenso einen Effekt auf den Forskolin-induzierten Calciumanstieg. In Abbildung 3.24 ist zu sehen, dass höhere Genisteinkonzentrationen in zunehmenden Maße die Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration hemmten, die 5µM Forskolin bei den INS-1-Zellen auslöste. Während in der Kontrollgruppe der Calciumspiegel durch 5µM Forskolin um $89\text{nM} \pm 23\text{nM}$ anstieg, lag diese Erhöhung nach Zugabe von 5µM Genistein bei $37\text{nM} \pm 1\text{nM}$ bzw. bei 100µM bei $8\text{nM} \pm 4\text{nM}$ (Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 2-4 Versuchen). Um das Risiko zu minimieren, dass dieser hemmende Effekt allein durch dem deutlichen Abfall der gemessenen Calciumkonzentration bei Genistein-Zufuhr selbst bedingt war, wurde auch der prozentuale Anstieg in Bezug auf die basale zytosolische Calciumkonzentration nach Zugabe von Genistein errechnet. Dabei erhöhte 5µM Forskolin ohne Genistein den intrazellulären Calciumspiegel im Durchschnitt um $55\% \pm 21\%$ und nach Inkubation mit 100µM Genistein um nur $13\% \pm 9\%$ (nicht gesondert dargestellt).

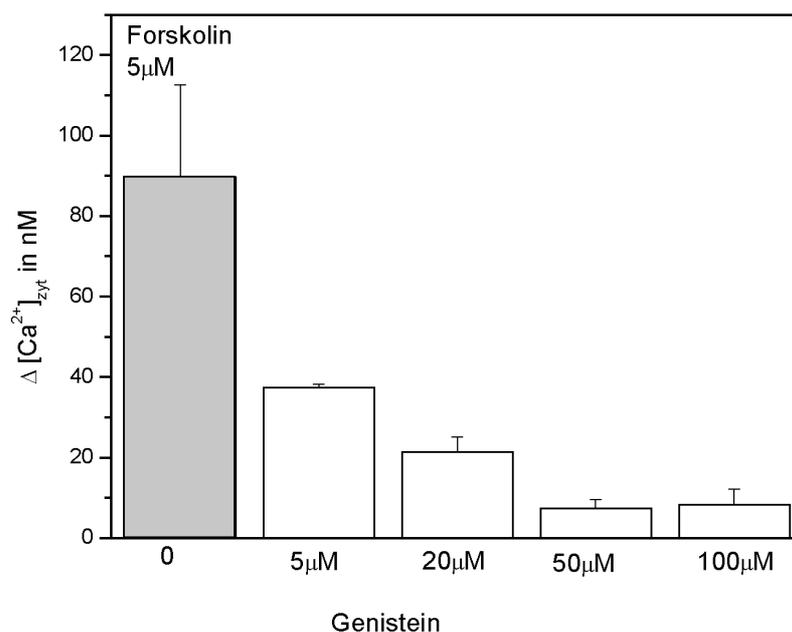


Abbildung 3.24: Darstellung der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($\Delta [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von 5µM Forskolin in Abhängigkeit von der vorherigen Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Genistein. Inkubationszeit 5 Minuten. (Mittelwerte aus 2-4 Messungen)

Neben den Calciummessungen an den INS-1-Zellen wurde der Effekt von Genistein auf das Membranpotential mit Bisoxonol am Fluoreszenzspektrometer analysiert. Genistein selbst zeigte hier, wie in den Abbildungen 3.25 und 3.26 zu sehen, keine reproduzierbare Änderung des Membranpotentials, die weitere Aussagen oder Berechnungen zuließ. Demgegenüber konnten reproduzierbar Veränderungen der GLP-1- und Forskolin-induzierten Änderung des zytosolischen Calciumspiegels beobachtet werden.

10^{-8}M GLP-1 führte in der Kontrollgruppe zu einer deutlichen und raschen Depolarisation. Nach Zufuhr von Genistein 5 bis 15min vor GLP-1 verkleinerte sich diese GLP-1-induzierten Depolarisation in Abhängigkeit von der jeweiligen Genisteinkonzentration. Bei $100\mu\text{M}$ Genistein war 10^{-8}M GLP-1 noch eine minimale Depolarisation abgrenzbar (Abbildung 3.25).

Im Vergleich hierzu bot sich nach Zugabe von Daidzein, einem ebenfalls untersuchten, inaktiven Genistein-Analogon, in einer Konzentration von $100\mu\text{M}$, eine Abnahme der Depolarisation der INS-1-Zellmembran bei 10^{-8}M GLP-1, die vergleichbar war mit der Reduktion durch $50\mu\text{M}$ Genistein.

So zeigten Genistein und in geringem Ausmaß auch Daidzein eine Reduktion der GLP-1-induzierten Membrandepolarisation der INS-1-Zellen.

Ebenso wie für GLP-1 zeigte eine Vorinkubation mit Genistein für 5 bis 15min eine Verringerung der Forskolin-bedingten Depolarisation. Aus Abbildung 3.26 ist ersichtlich, dass höhere Genisteinkonzentrationen zu einer stärkeren, konzentrationsabhängigen Verringerung der Membrandepolarisation führten, die durch $5\mu\text{M}$ Forskolin ausgelöst wurde. Ganz unterdrücken ließ sich jedoch auch bei $100\mu\text{M}$ Genistein die Membrandepolarisation durch Forskolin nicht.

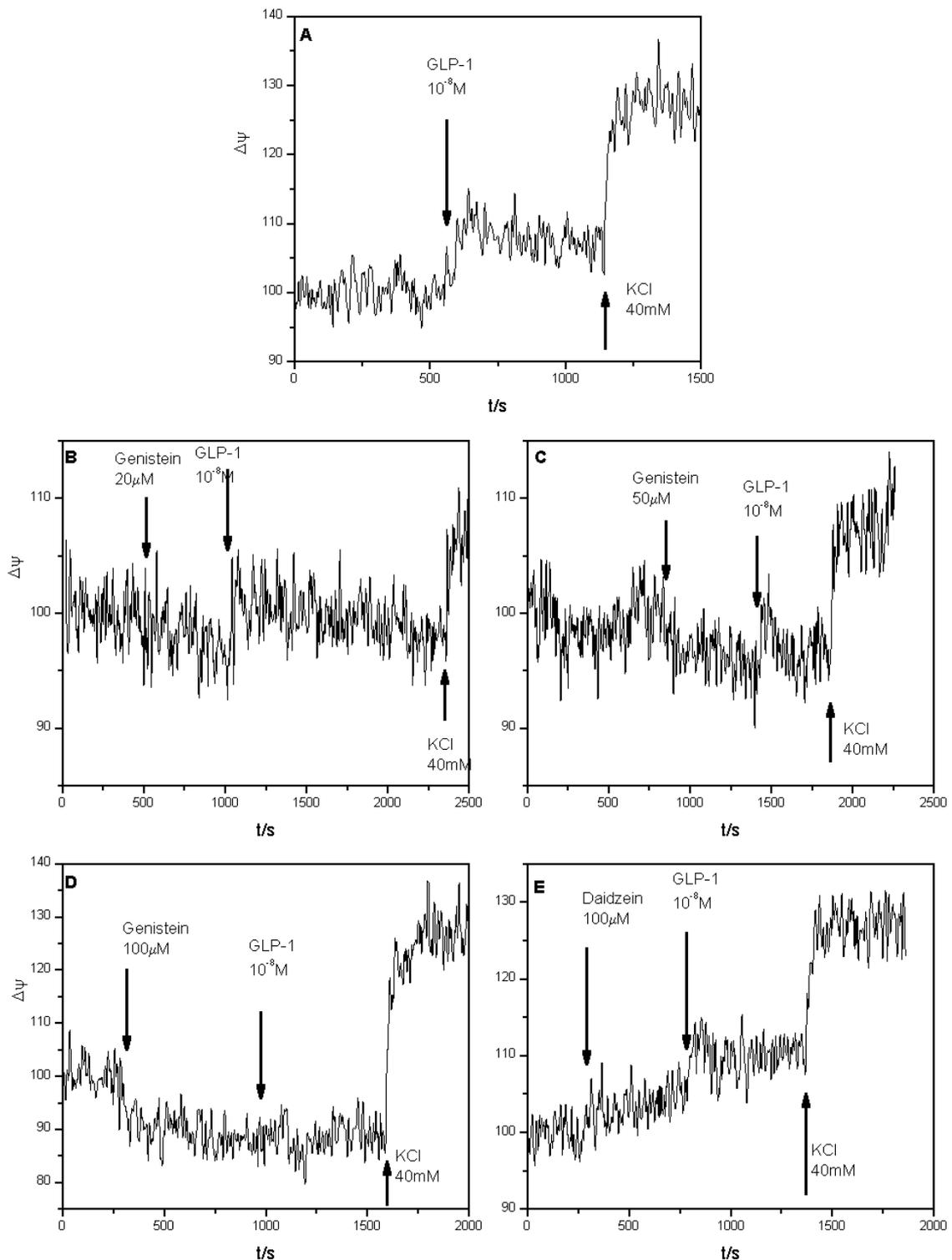


Abbildung 3.25: Darstellung von Änderungen des Membranpotentials ($\Delta\psi$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von $10^{-8} M$ GLP-1. **A** als Kontrolle. Bei **B** Zugabe von $20 \mu M$ Genistein, bei **C** $50 \mu M$ Genistein und **D** $100 \mu M$ Genistein. Bei **E** Zugabe von $100 \mu M$ Daidzein. Gaben jeweils 5-10 Minuten vor GLP.

Als Vergleichsgröße für Membranpotentialänderungen gilt die Depolarisation der Zellmembran nach Zugabe von $40 mM$ KCl.

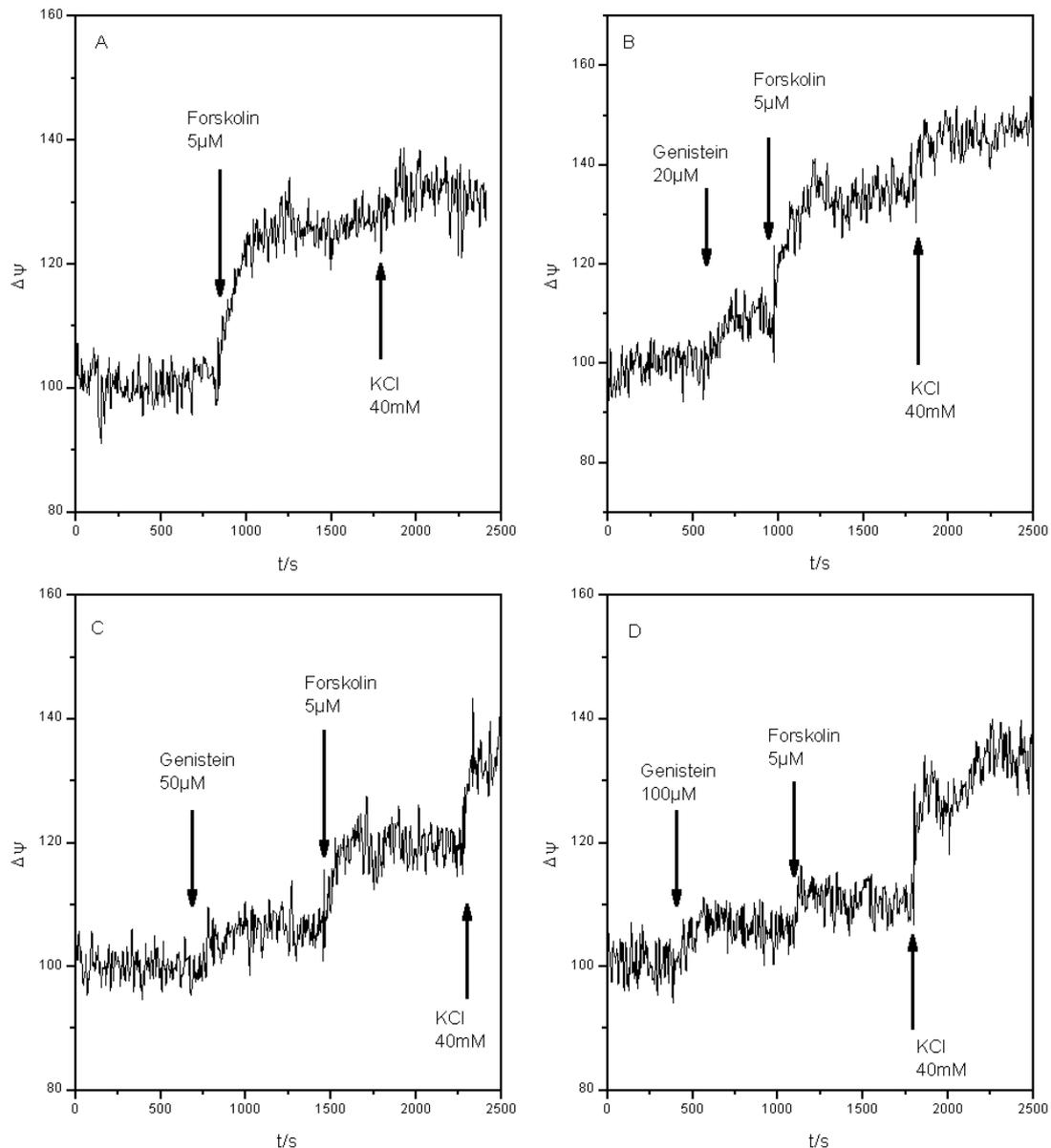


Abbildung 3.26: Darstellung von Änderungen des Membranpotentials ($\Delta\psi$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von 5 μM Forskolin. **A** als Kontrolle. Bei **B** Zugabe von 20 μM Genistein, bei **C** 50 μM Genistein und bei **D** 100 μM Genistein jeweils 10 Minuten vor dem Forskolin.

Als Vergleichsgröße für Membranpotentialänderungen gilt die Depolarisation der Zellmembran nach Zugabe von 40 mM KCl. (Exemplarisch für 2 Versuche)

Nachdem die Auswirkungen von Genistein auf die INS-1-Zellen mit Hilfe von Calciummessungen und Membranpotentialmessungen analysiert worden waren, wurde gleichermaßen der Einfluss auf die Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln am Fluoreszenzmikroskop überprüft.

Bei 11mM Glukose zeigte Genistein, insbesondere bei höheren Konzentrationen zwischen 50 und 100 μ M, einen massiven Abfall der zytosolischen Calciumkonzentration der β -Zellen auf ein Niveau, auf dem der Calciumspiegel bei 3mM Glukose zu Versuchsbeginn lag (Abbildung 3.28 und 3.29 C/D). Bei 50 μ M Genistein lag dieser Abfall bei 52%, bei 100 μ M bei 56% der ursprünglichen Calciumwerte bei 11mM Glukose (Mittelwerte aus 2-3 Versuchen). Bei kleineren Konzentrationen, wie zum Beispiel in Abbildung 3.27 10 μ M, bewirkte Genistein eine Erhöhung der Frequenz der Glukose-induzierten Oszillationen und eine Abnahme ihrer Amplitude. Bei hohen Genisteinkonzentrationen verschwanden die Oszillationen vollständig. Nach Beendigung der Genisteinsuperfusion erhöhte sich die intrazelluläre Calciumkonzentration wieder auf ein Niveau der 11mM Glukose entsprechend und die Oszillationen begannen erneut bzw. ihre Amplitude vergrößerte sich.

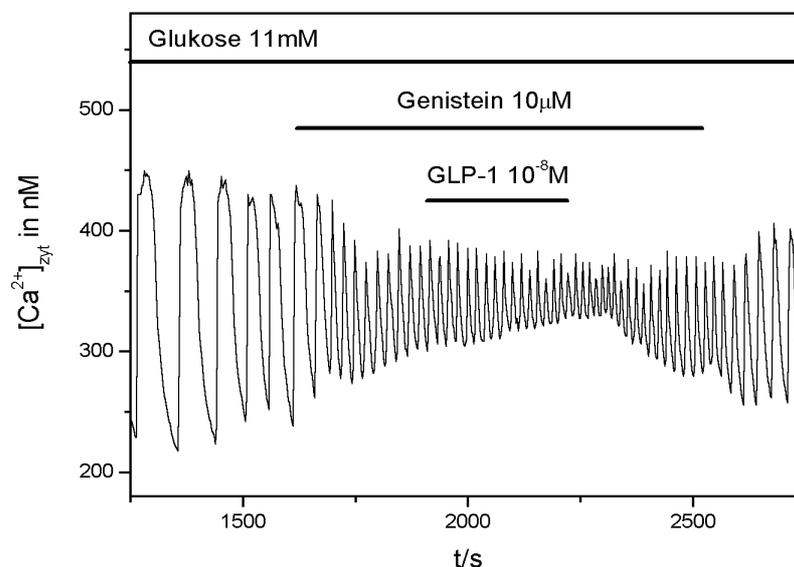


Abbildung 3.27: Exemplarische Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der β -Zellen der Langerhansschen Insel bei Superfusion von 10 μ M Genistein zusätzlich zu 11mM Glukose und 10 $^{-8}$ M GLP-1.

Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird 3mM Glukose zugefügt.

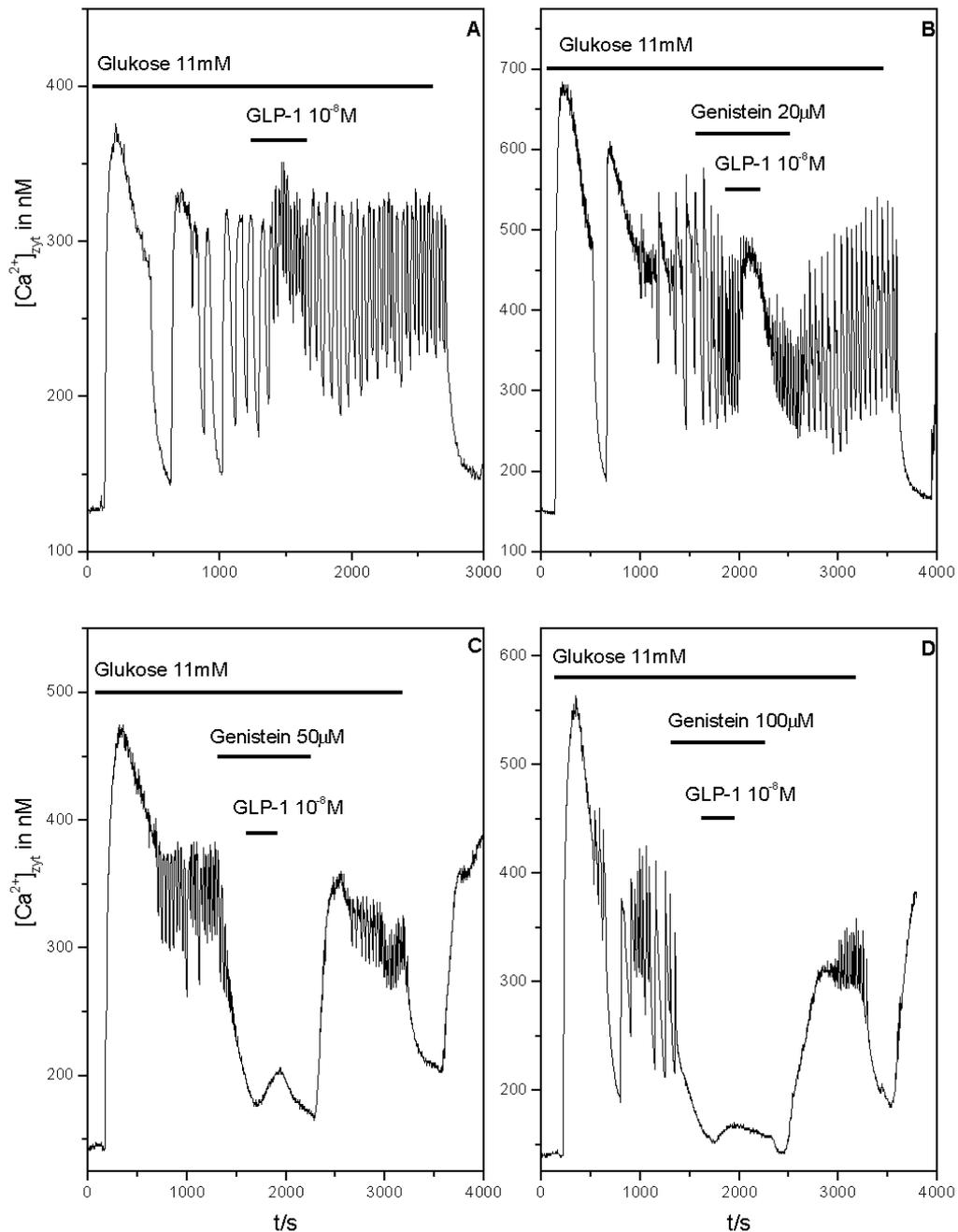


Abbildung 3.28: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln. **A** als Kontrollbeispiel bei Superfusion mit $10^{-8}M$ GLP-1. Bei **B** zusätzliche Superfusion mit $20\mu M$ Genistein, bei **C** mit $100\mu M$ Genistein, bei **D** Superfusion von $100\mu M$ Genistein.

Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird $3mM$ Glukose zugefügt. (Exemplarisch für je 2-4 Versuche)

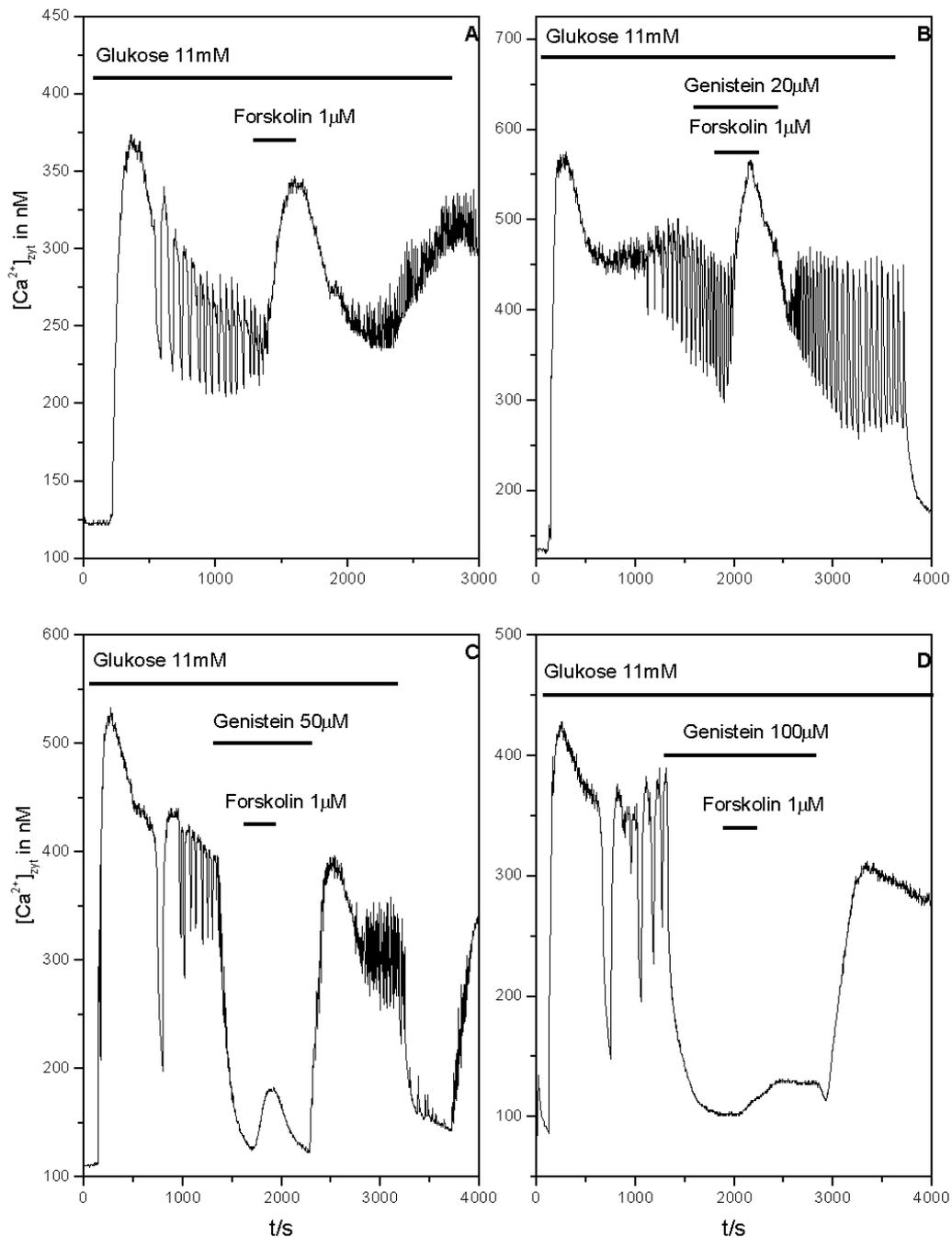


Abbildung 3.29: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln. **A** als Kontrolle bei Superfusion mit 1 μ M Forskolin. Bei **B** zusätzliche Superfusion mit 20 μ M Genistein, bei **C** mit 50 μ M Genistein und bei **D** mit 100 μ M Genistein.

Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird 3mM Glukose zugefügt.

Zusätzlich zu den massiven Veränderungen der Glukose-induzierten Effekte an der Langerhansschen Insel beeinflusste Genistein auch den GLP-1-bedingten Calciumanstieg. Wie Abbildung 3.28 darstellt, nahm mit größerer Genisteinkonzentration ebenfalls die GLP-1-induzierten Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration ab. Dies galt dabei genauso für die Absolutwerte in nM wie für die relativen prozentualen Werte, die für den Anstieg des Calciums in Abhängigkeit von dem Ausgangscalciumwert errechnet wurden. Bei 11mM Glukose führte 10^{-8} M GLP-1 zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration um $64\% \pm 35\%$. Bei Inkubation mit 20μ M Genistein lag dieser Anstieg bei $41\% \pm 29\%$ und bei Zugabe von 50μ M Genistein bei $11\% \pm 6\%$ (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2-4 Experimenten). So konnte für Genistein eine Reduktion des GLP-1-bedingten Calciumanstiegs nachgewiesen werden. In Relation zu den massiven Veränderung Glukose-induzierten Effekte, erscheint jedoch eine zusätzliche Wirkung von Genistein auf die GLP-1-bedingte Calciumerhöhung eher gering sein.

Derselbe reduzierende Effekt fand sich auch für die Wirkung, die 1μ M Forskolin auf die β -Zellen hatte (Abbildung 3.29). Hier kam es ebenso durch Genistein in Abhängigkeit von der Konzentration zu einer Inhibition des Forskolin-induzierten Anstiegs des intrazellulären Calciumspiegels sowohl für die Absolutwerte in nM wie die Prozentualwerte.

3.3.2 Messungen mit Herbimycin A als Hemmstoff der Tyrosinkinasen

Zur Absicherung der Messergebnisse wurde neben Genistein ein zweiter Tyrosinkinasehemmstoff untersucht. Herbimycin A zeigte im Vergleich zu Genistein deutlich weniger Einfluss auf den intrazellulären Calciumspiegel bei den INS-1-Zellen in der Messung mit Fura-2 am Fluoreszenzspektrometer. So senkte sich zum Beispiel wie exemplarisch in Abbildung 3.30 bei 10μ M Herbimycin A der Calciumspiegel von 160nM auf 135nM. Bei 5μ M Genistein im Beispiel oben (Abbildung 3.23) lag die Reduktion der gemessenen zytosolische Calciumkonzentration bei 72nM (192nM auf 118nM).

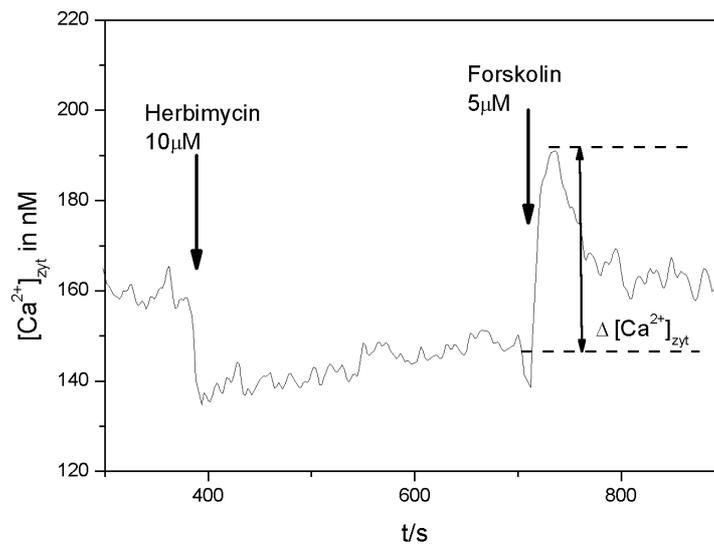


Abbildung 3.30: Beispieldarstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von $10\mu M$ Herbimycin A und $5\mu M$ Forskolin.

Der im Balkendiagramm 3.31 dargestellte Zusammenhang zwischen der Forskolin-induzierten Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels und der Höhe der Herbimycinkonzentration zeigt ebenso wie für Genistein eine konzentrationsabhängige Reduktion der Forskolinwirkung. So wurde der Calciumpeak von $89nM \pm 23nM$ bei $5\mu M$ Forskolin zum Beispiel auf $50nM \pm 11nM$ durch vorheriger Zugabe von $10\mu M$ Herbimycin A verringert (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2-4 Versuchen).

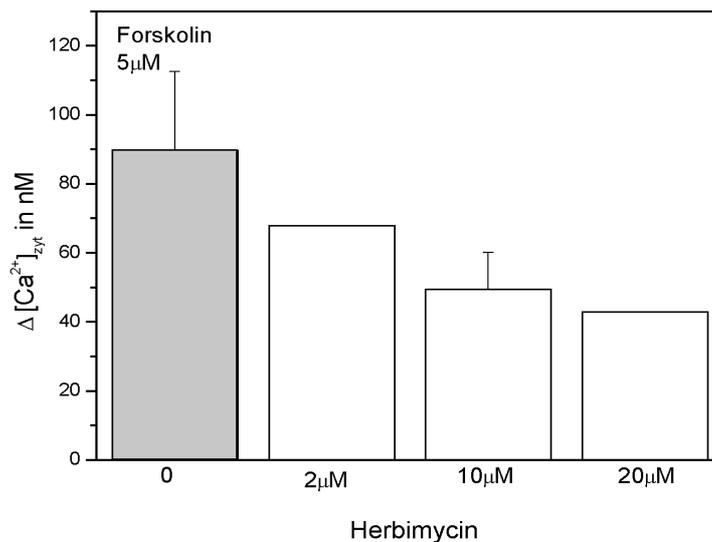


Abbildung 3.31: Darstellung der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($\Delta [Ca^{2+}]_{zyt}$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von $5\mu M$ Forskolin in Abhängigkeit von der vorherigen Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Herbimycin A. Inkubationszeit 5-10 Minuten. (Bei 0 und $10\mu M$ Mittelwerte aus je 3 Messungen)

Bei der Analyse des Membranpotentials der INS-1-Zellen bewirkte Herbimycin A, dargestellt beispielhaft für jeweils 2-3 Experimente (Abbildung 3.32), eine leichte Inhibition der Forskolin-bedingten Membrandepolarisation. So zeigte sich ohne oder unter Gabe von 5 μ M Herbimycin A eine deutliche Depolarisation der INS-1-Zellen bei Zugabe von 5 μ M Forskolin. Bei Vorinkubation mit 10 μ M Herbimycin A nahm diese Depolarisation leicht ab.

Des weiteren wurde die Wirkung von Herbimycin A auf die β -Zellen der Langerhans'-schen Inseln am Fluoreszenzmikroskop untersucht. 10 μ M Herbimycin führten zu einem langsamen, leichten Abfall des Glukose-induzierten Calciumniveaus und bewirkte ebenso eine leichte Reduktion des Forskolin-induzierten Calciumanstiegs. Ohne Zusatz weiterer Substanzen, erhöhte sich unter 11mM Glukose die zytosolische Calciumkonzentration der β -Zellen bei 1 μ M Forskolin um 69% \pm 25%. Im hier abgebildeten Versuch lag diese Steigerung nach Superfusion mit 10 μ M Herbimycin bei 24% (Abbildung 3.33).

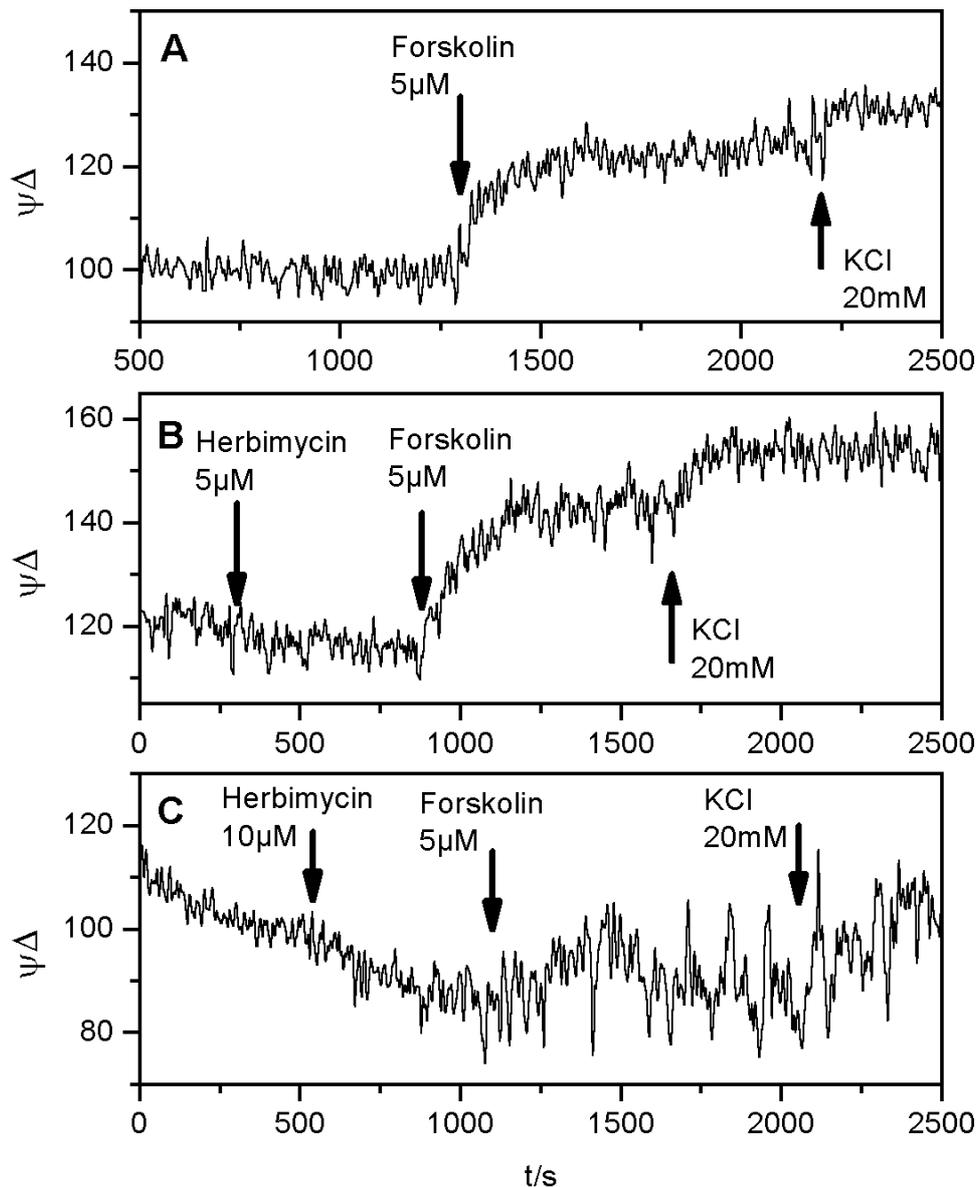


Abbildung 3.32: Darstellung von Änderungen des Membranpotentials ($\Delta\psi$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von 5 μ M Forskolin. **A** als Kontrolle. Bei **B** Zugabe von 5 μ M Herbimycin und bei **C** 10 μ M Herbimycin jeweils 10 Minuten vor Forskolin. Als Vergleichsgröße für Membranpotentialänderungen gilt die Depolarisation der Zellmembran nach Zugabe von 20 mM KCl (Exemplarisch für 2 Versuche)

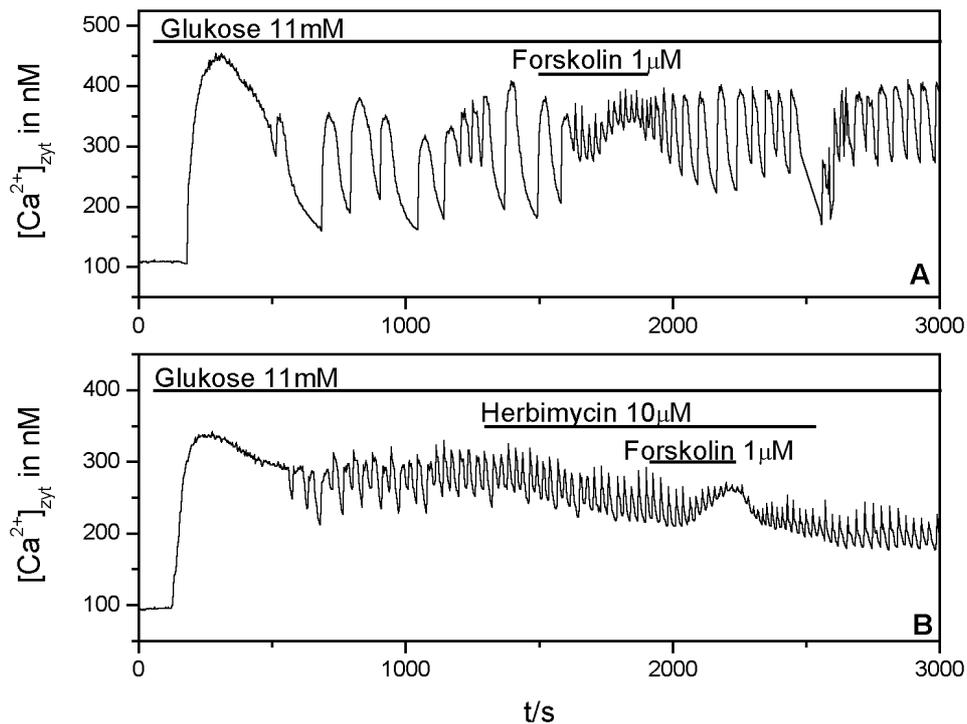


Abbildung 3.33: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln. **A** als Kontrolle bei Superfusion mit $1\mu\text{M}$ Forskolin. Bei **B** zusätzliche Superfusion mit $10\mu\text{M}$ Herbimycin. Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird 3mM Glukose zugefügt.

3.4 Wirkung des unspezifischen Proteinkinasehemmstoffes Staurosporin auf die GLP-1- und Forskolin-induzierten Effekte an INS-1-Zellen und Langerhansschen Inseln

Nach der Analyse verschiedener, spezifischer Hemmstoffe bei unterschiedlichen Proteinkinasen wurde der unspezifische, aber sehr potente Proteinkinasehemmstoff Staurosporin untersucht. Wegen seiner hohen Wirksamkeit eignet er sich besonders, um den modulierenden Einfluss der Proteinkinasen zu beobachten.

In Abbildung 3.34 ist beispielhaft die zytosolische Calciumkonzentration der INS-1-Zellen am Fluoreszenzspektrometer im Zeitverlauf nach Zugabe von $1\mu\text{M}$ Staurosporin und nachfolgend 10^{-8}M GLP-1 in die Messküvette dargestellt. Staurosporin selbst führte

zu einem kurzen Anstieg der Calciumkonzentration in Form eines Peaks. Nachfolgend fiel der intrazelluläre Calciumspiegel ohne Plateau wieder auf das Ausgangsniveau zurück (Die hier zu sehende Anhebung entsprach dem langsamen kontinuierlichem Calciumanstieg über die gesamte Versuchsdauer). Die Höhe des Peaks war dabei von der Staurosporinkonzentration abhängig und nahm mit seiner Vergrößerung zu. So lag dieser Anstieg ausgelöst durch 50nM Staurosporin bei $15\text{nM} \pm 6\text{nM}$ und betrug bei $1\mu\text{M}$ Staurosporin $55\text{nM} \pm 25\text{nM}$ (Mittelwert und Standardabweichung aus 4 Versuchen).

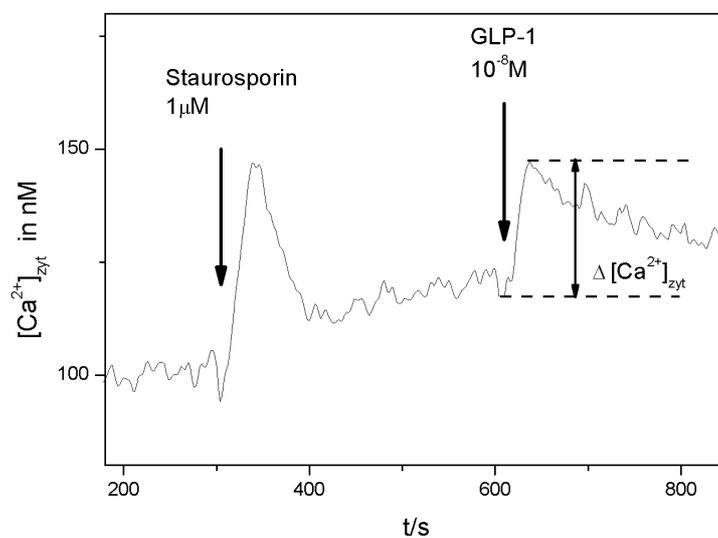


Abbildung 3.34: Beispieldarstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von $1\mu\text{M}$ Staurosporin und $5\mu\text{M}$ Forskolin.

Wurde den INS-1-Zellen in der Calciummessung Staurosporin zugegeben, verringert sich die GLP-1-bedingte Erhöhung der zytosolische Calciumkonzentration in Abhängigkeit von der zugefügten Staurosporinkonzentration. In Abbildung 3.35 A zeigt sich, dass der Anstieg des zytosolischen Calciumspiegels bei 10^{-8}M GLP-1 in der Kontrollgruppe um $65\text{nM} \pm 24\text{nM}$ betrug. Diese GLP-1-induzierte Calciumerhöhung lag bei vorheriger Inkubation mit 50nM Staurosporin bei $71\text{nM} \pm 15\text{nM}$, mit 200nM Staurosporin bei $49\text{nM} \pm 5\text{nM}$. $1\mu\text{M}$ Staurosporin verringerte sie auf $18\text{nM} \pm 11\text{nM}$. Staurosporin hemmte somit den GLP-1-induzierten Calciumanstieg. Die Inkubationszeiten lagen dabei zwischen 5 und 15 Minuten (Mittelwerte und Standardabweichungen, soweit beides angegeben aus je 4 Versuchen).

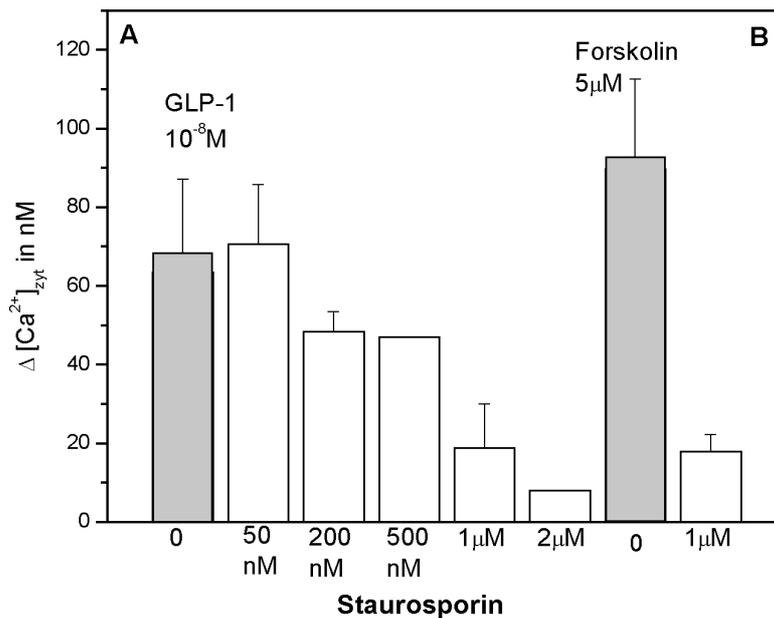


Abbildung 3.35: Darstellung der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ($\Delta [Ca^{2+}]_{zyt}$) der INS-1-Zellen **A** bei Zugabe von $10^{-8}M$ GLP-1 und **B** bei Zugabe von $5\mu M$ Forskolin in Abhängigkeit von der vorherigen Inkubation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Staurosporin. Inkubationszeit 5-15 Minuten. (Mittelwerte aus je 3-4 Messungen)

Ebenso wie für GLP-1 induzierte Staurosporin auch eine Inhibition der Forskolin-bedingten Erhöhung des zytosolischen Calciumkonzentration (Abbildung 3.35 B). Die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, die bei alleiniger Zugabe von $5\mu M$ Forskolin in der Kontrollgruppe bei $89nM \pm 23nM$ lag, verkleinerte sich bei Inkubation mit $1\mu M$ Staurosporin auf $18nM \pm 4nM$ (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Experimenten).

Bei der Untersuchung des Einflusses von Staurosporin auf das Membranpotential zeigte sich bei den INS-1-Zellen anders als bei den Calciummessungen am Fluoreszenzspektrometer, dass Staurosporin selbst keinen Einfluss auf das Membranpotential der INS-1-Zellen hat. Es bewirkte, wie in Abbildung 3.36 zu sehen, auch in höheren Konzentrationen weder eine Depolarisation noch eine Hyperpolarisation.

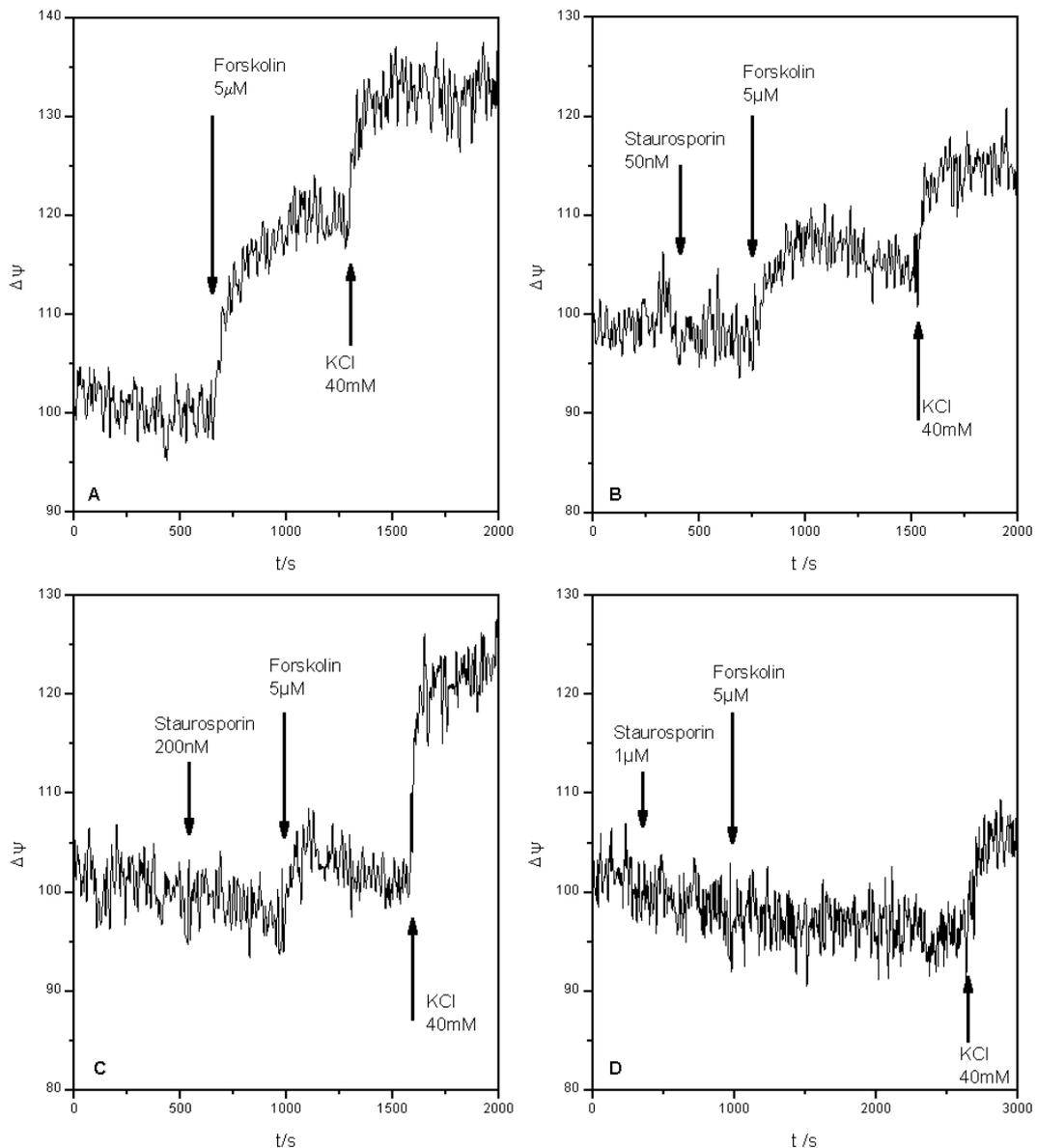


Abbildung 3.36: Darstellung von Änderungen des Membranpotentials ($\Delta\psi$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von $5\mu\text{M}$ Forskolin. **A** als Kontrolle. Bei **B** Zugabe von 50nM Staurosporin, bei **C** 200nM Staurosporin und bei **D** $1\mu\text{M}$ Staurosporin jeweils 5-10 Minuten vor dem Forskolin.

Als Vergleichsgröße für Membranpotentialänderungen gilt die Depolarisation der Zellmembran nach Zugabe von 40mM KCl.

Die Zugabe von 5 μ M Forskolin führte, wie bereits erwähnt, zu einer deutlichen, raschen, plateauförmigen Depolarisation der INS-1-Zellen. Diese Depolarisation verringerte sich bei vorheriger Zugabe von Staurosporin und Inkubation der INS-1-Zellen über 5 bis 15min. Wie aus der Abbildung 3.36 ersichtlich ist, reduzierte sich die Forskolin-induzierte Depolarisation in Abhängigkeit von der Staurosporinkonzentration, so dass sich bei Zugabe von 1 μ M Staurosporin keine eindeutige Depolarisation durch 5 μ M Forskolin mehr nachweisen ließ.

Neben den Auswirkungen auf Forskolin wurde der Einfluss von Staurosporin auf ein Analogon von cAMP, cpt-cAMPs untersucht. Als cAMP-Agonist bewirkt cpt-cAMPs ebenso eine cAMP-abhängig Membrandepolarisation, wie auch GLP-1 und Forskolin. Staurosporin vermindert diese cpt-cAMPs-induzierte Depolarisation in Abhängigkeit von der Konzentration (Abbildung 3.37).

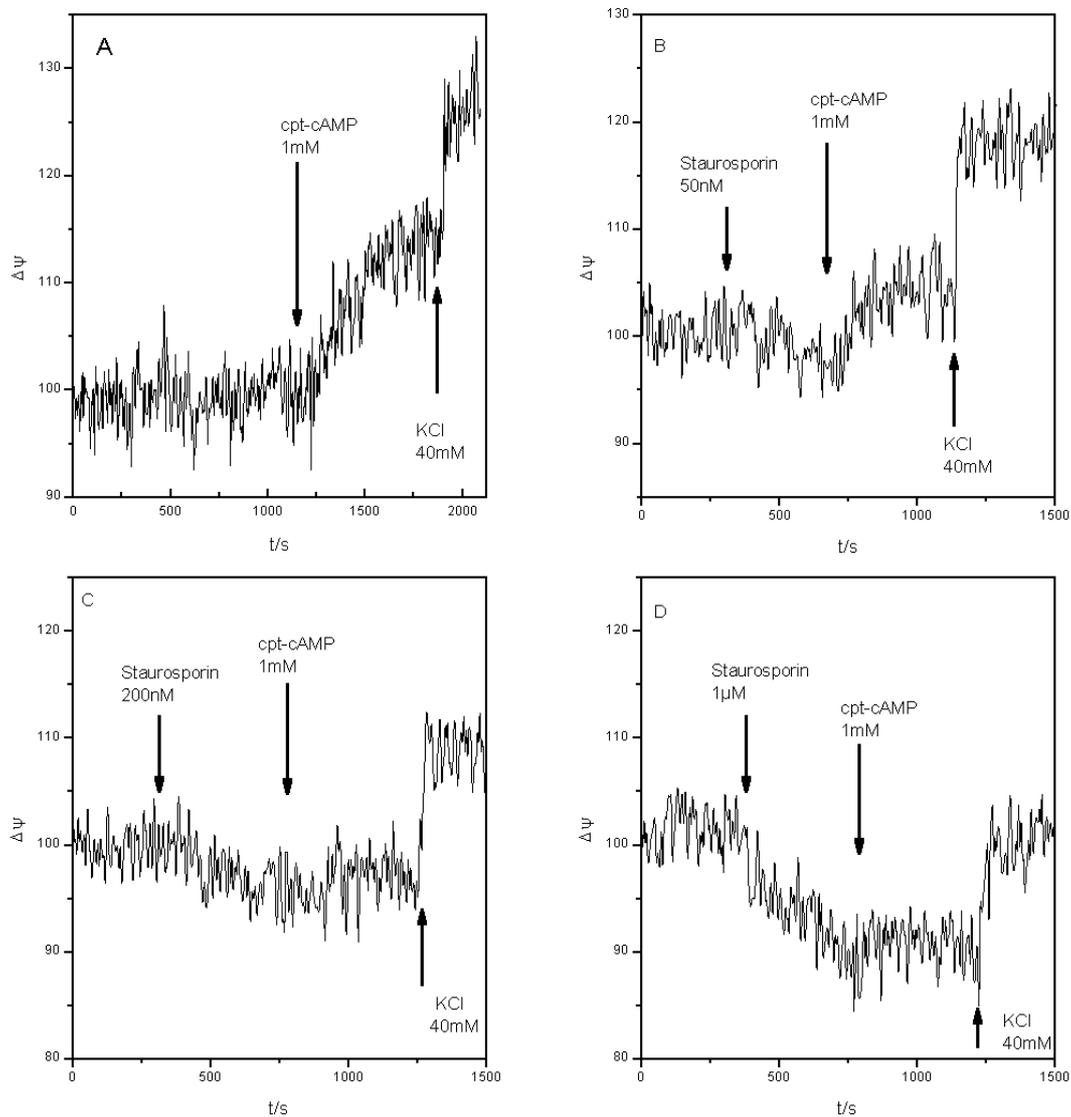


Abbildung 3.37: Darstellung von Änderungen des Membranpotentials ($\Delta\psi$) der INS-1-Zellen bei Zugabe von 1mM cpt-cAMPs. **A** als Kontrolle. Bei **B** Zugabe von 50nM Staurosporin, bei **C** 200nM Staurosporin und bei **D** 1 μ M Staurosporin jeweils 5-10 Minuten vor cpt-cAMPs.

Als Vergleichsgröße für Membranpotentialänderungen gilt die Depolarisation der Zellmembran nach Zugabe von 40mM KCl.

Nachdem Staurosporin eine deutliche Reduktion der GLP-1-, Forskolin- und cAMPs-induzierten Effekte auf den Calciumspiegel und die Membrandepolarisation der INS-1-Zellen bewirkt hatte, wurde der Einfluss auf die Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln der Maus am Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Zunächst wurden die Veränderungen auf die Variationen der zytosolischen Calciumkonzentration bedingt durch Glukose beobachtet. Wurde Staurosporin der Superfusionslösung mit 11mM Glukose hinzugefügt, führte dies, wie aus Abbildung 3.38 ersichtlich, zu einer deutlichen Änderung im Verhalten der Glukose-induzierten Oszillationen. Die Amplitude der Oszillationen wurde merklich reduziert und die Frequenz erhöhte sich.

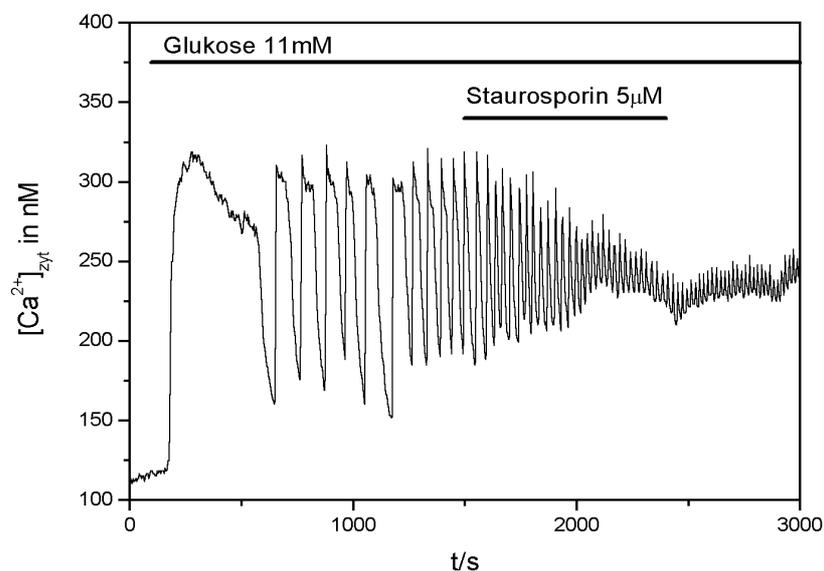


Abbildung 3.38: Exemplarische Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der β -Zellen der Langerhansschen Insel bei Superfusion von $5\mu M$ Staurosporin.

Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird 3mM Glukose zugefügt. (Exemplarisch für je 3Versuche)

In Experimenten, bei denen die Langerhansschen Inseln schon bei 3mM Glukose mit verschiedenen Staurosporinkonzentrationen inkubiert wurden, kam es zu einer ausgeprägten Reduktion des Glukose-induzierten Anstiegs der zytosolischen Calciumkonzentration. Die Erhöhung der Glukosekonzentration auf 11mM, die in der Kontrollgruppe zu einem Anstieg der Calciumkonzentration um durchschnittlich 280nM geführt hatte, bewirkte bei Inkubation mit $5\mu M$ Staurosporin nur eine Erhöhung des

Calciumspiegels von $135\text{nM} \pm 6\text{nM}$ auf $193\text{nM} \pm 8\text{nM}$. Und verkleinerte sich somit auf 58nM bzw. 20% (Mittelwerte und Standardabweichung aus 2 Messungen). Abbildung 3.40F zeigt, dass dieser hemmende Effekt bei längerer Vorinkubation mit Staurosporin stark zu nahm, so dass bei 35 minütiger Vorinkubation mit $5\mu\text{M}$ Staurosporin kein wesentlicher Glukose-induzierter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nachweisbar war.

Parallel zum Einfluss von Staurosporin auf die Glukose-induzierten Verhaltensweisen der Langerhansschen Inseln führte es zu einer Verminderung der GLP-1-Wirkung (Abbildung 3.39). Der durch 10^{-8}M GLP-1 induzierte Anstieg des zytosolischen Calciumspiegels wurde mit zunehmender Staurosporinkonzentration geringer. So betrug diese Erhöhung in der Kontrolle $64\% \pm 35\%$ und bei Zugabe von $0,5\mu\text{M}$ Staurosporin $57\% \pm 23\%$ und bei $5\mu\text{M}$ 23% (Mittelwert und Standardabweichung aus 2 Experimenten).

Auch die Forskolin-bedingte Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration wurde durch Staurosporin gehemmt. Aus Abbildung 3.40 geht hervor, dass neben der Konzentration des Staurosporins auch der Inkubationszeitraum eine große Bedeutung hatte. So bewirkte die 25-minütige Superfusion mit $2\mu\text{M}$ eine größere Hemmung als die mit $5\mu\text{M}$ für 5 Minuten. Bei 35-minütiger Vorinkubation mit $5\mu\text{M}$ Staurosporin ließ sich keine eindeutige Forskolin-induzierte Calciumerhöhung mehr abgrenzen (Abbildung 3.40F).

Wird die Wirkung von Staurosporin auf den Glukose-induzierten Calciumanstieg mit Reduktion der GLP-1- und Forskolin-bedingten Effekte verglichen, zeigt sich somit insgesamt, dass diese Hemmung parallel ist. Eine über die Verringerung der Glukose-induzierten Effekte hinausgehende Hemmung konnte für somit für Staurosporin an den Langerhansschen Inseln nicht nachgewiesen werden.

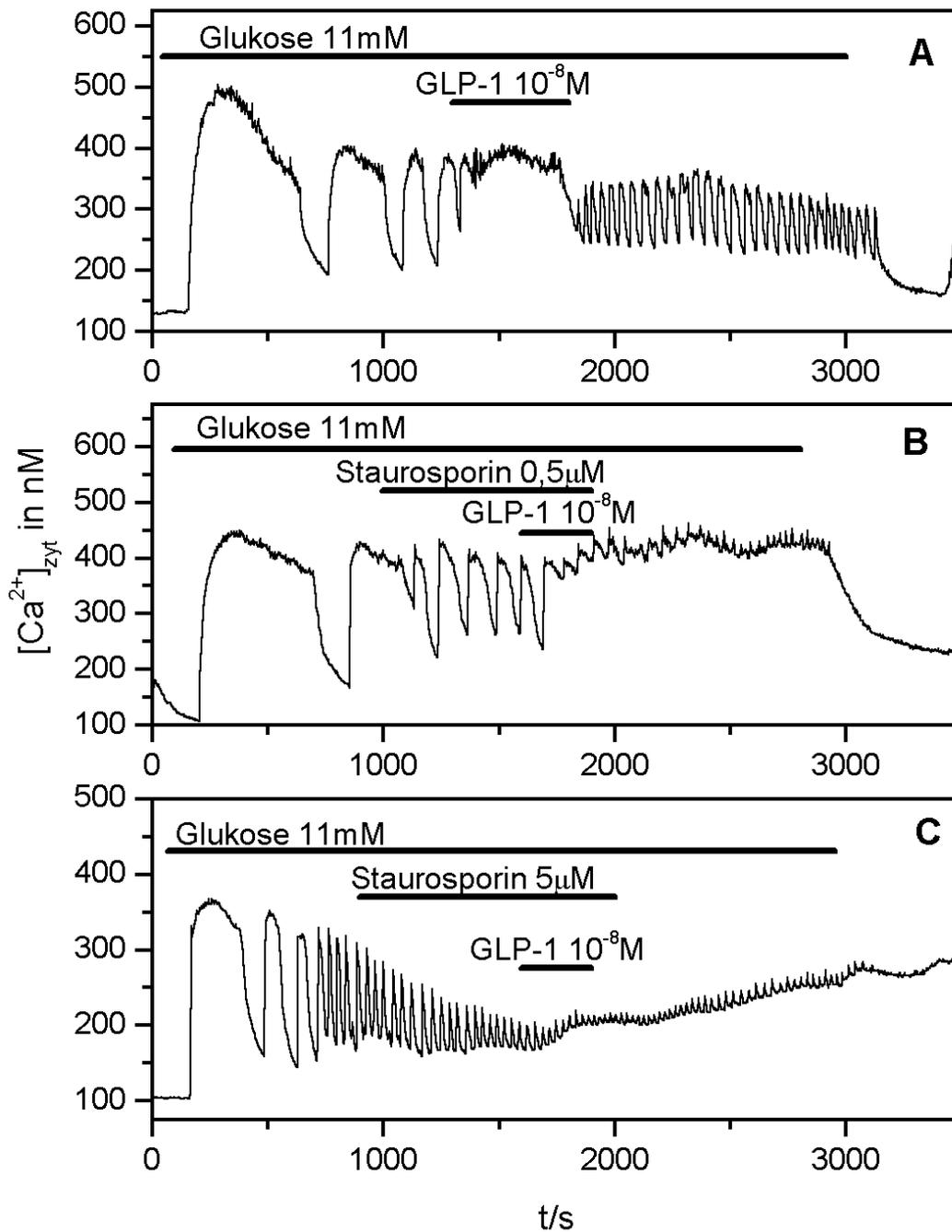


Abbildung 3.39: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln. A als Kontrolle bei Superfusion mit $10^{-8} M$ GLP-1. Bei B zusätzliche Superfusion mit $0,5 \mu M$ Staurosporin und bei C mit $5 \mu M$ Staurosporin.

Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird $3mM$ Glukose zugefügt.

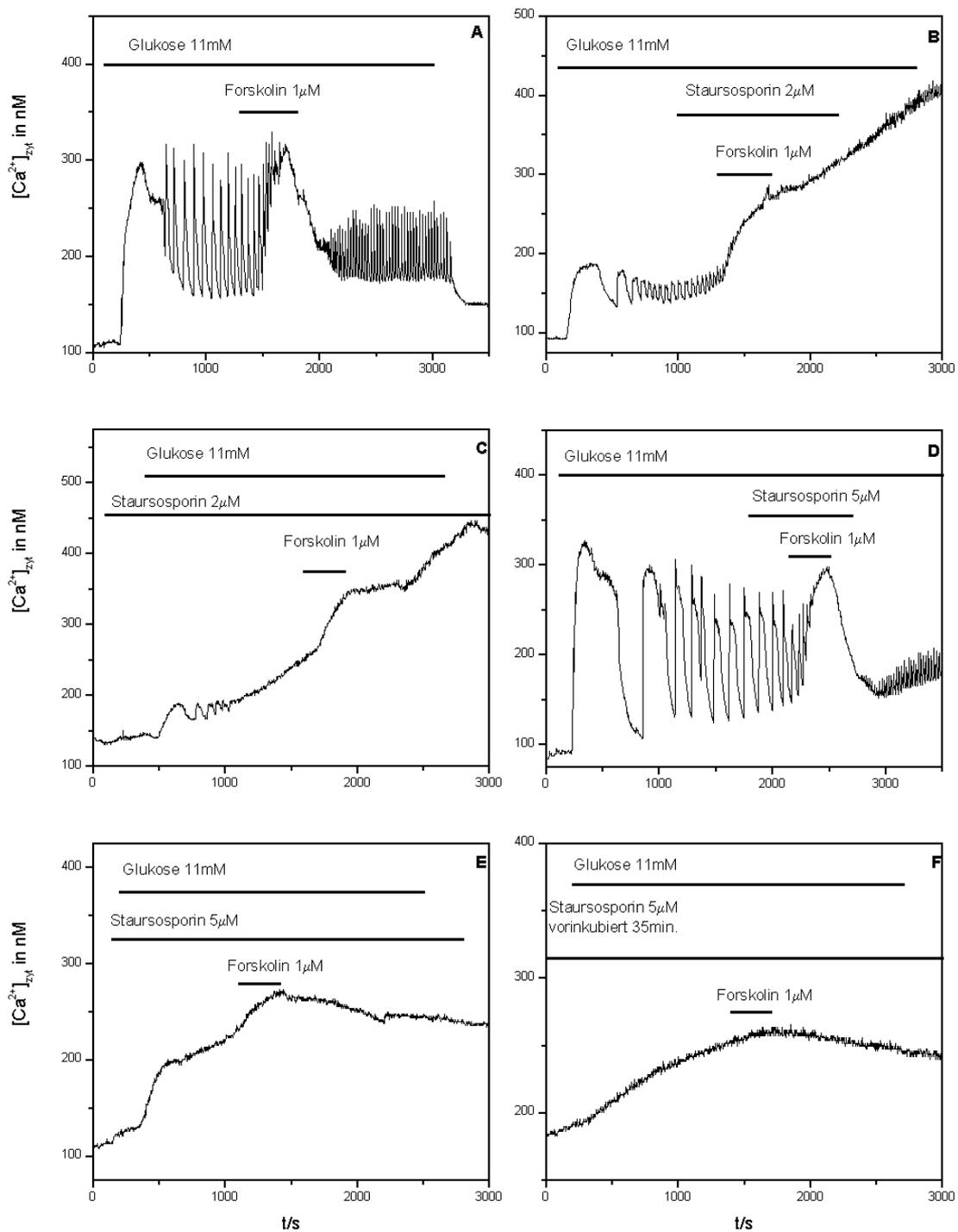


Abbildung 3.40: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{i_{zyt}}$) der β -Zellen der Langerhansschen Inseln. **A** als Kontrolle bei Superfusion mit $1\mu M$ Forskolin. Bei **B** zusätzliche Superfusion mit $2\mu M$ Staurosporin, bei **C** mit $2\mu M$ Staurosporin schon bei $3mM$ Glukose, bei **D** Superfusion von $5\mu M$ Staurosporin, bei **E** mit $5\mu M$ Staurosporin schon bei $3mM$ Glukose und bei **F** mit vorheriger Inkubation der Insel mit $5\mu M$ Staurosporin für 35 Minuten.

Die Superfusionsdauer ist durch den horizontalen Balken markiert. Soweit keine andere Glukosekonzentration durch einem Balken angegeben ist, wird $3mM$ Glukose zugefügt.

4. Diskussion

4.1 Interpretation der Ergebnisse der Proteinkinase A-Hemmstoffe

Die Signaltransduktion von GLP-1, das heißt der Weg auf dem GLP-1 seine Wirkung auf die Insulinsekretion in der β -Zelle weiter gibt, ist von starkem Interesse für einen therapeutischen Ansatz in der Behandlung des Diabetes mellitus Typ2, da GLP-1 als starkes Inkretin ein wichtiger Potentiator der Insulinsekretion ist und auch an anderen Organen positive Eigenschaften auf den Glukosestoffwechsel hat. Viele Schritte der Signaltransduktion sind noch nicht bekannt oder werden zum Teil sogar kontrovers diskutiert. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht nun die Frage nach der Beteiligung von Proteinkinasen, insbesondere der Proteinkinase A und der Tyrosinkinasen, an der Calcium-abhängigen Signaltransduktion von GLP-1 in den β -Zellen des Pankreas.

Als gesichert gilt, dass GLP-1 an den GLP-1-Rezeptor bindet, der der Gruppe der G_s -Protein-gekoppelten Rezeptoren zuzuordnen ist (siehe Kapitel 1.4; Abbildung 1.4). Dieser bewirkt über das Adenylatzyklase-System eine Erhöhung des cAMP-Spiegels im Zellinneren [Göke R. et al., 1988, Segre et al., 1993].

Forskolin ist ein zellpermeables Diterpen, das den Adenylatzyklase/ G_s - α -Komplex direkt ohne Bindung an einen vorgeschalteten Rezeptor aktivieren kann und erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration [Insel et al., 2003; Henquin et al., 1984]. Nicht erwünschte Einflüsse der Proteinkinasehemmstoffe am GLP-1-Rezeptor können mit der parallelen Betrachtung von GLP-1 und Forskolin ausgeschlossen werden.

Auch durch Glukose selbst bzw. die Glukose-induzierte Calciumerhöhung kann, wenn auch nur in geringem Maße, cAMP produziert werden, indem es eine Calcium/Calmodulin-sensitive Isoform der Adenylzyklase (Typ 3) aktiviert [Tian et al., 2001; Schuit et al., 1985].

Allgemein bekannt werden intrazelluläre Erhöhungen des cAMP-Spiegels oft über Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A weitergegeben, so dass man im Zusammenhang mit der GLP-1-induzierten Erhöhung der Insulinsekretion eine Beteiligung von Proteinkinase A vermutet. Unter Verwendung verschiedener spezifischer Inhibitoren wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Proteinkinase A auf die

durch GLP-1 bzw. cAMP-induzierte Vergrößerung des zytosolischen Calciumspiegels und die Membrandepolarisation untersucht.

Unter einer stimulativen Glukosekonzentration, wie in den Versuchen dieser Arbeit (10mM bei den INS-1-Messungen und 11mM bei den Versuchen mit den Langerhansschen Inseln), führten GLP-1 und Forskolin zu einer deutlichen und prompten Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels sowohl bei den INS-1-Zellen als auch bei den Langerhansschen Inseln. Die Größe des Calciumanstiegs bei 10^{-8} M GLP-1 betrug 64nM bei den INS-1-Zellen bzw. 64% bei den Inseln und lag somit in einem ähnlichen Bereich wie die Erhöhung, die durch 5 bzw. 1 μ M Forskolin erreicht wurde (89nM bzw. 69,6%). Bei den Langerhansschen Inseln veränderten GLP-1 und Forskolin in gleichem Maße auch die Oszillationen, deren Frequenz höher und deren Amplitude niedriger wurde. Ebenso war durch 10^{-8} M GLP-1-bedingte Depolarisation der INS-1-Zelle in Relation ähnlich ausgeprägt im Vergleich mit der Depolarisation bei 5 μ M Forskolin (siehe Kapitel 3.1.1, 3.1.2 und 3.1.4). Die Effekte von GLP-1 und Forskolin auf den Calciumspiegel und die Membrandepolarisation sind somit gut vergleichbar. Das legt nahe, dass die beobachteten Effekte von GLP-1 durch cAMP, durch Aktivierung der Adenylatzyklase, vermittelt waren.

Geringer Unterschied zum Beispiel in der Plateauphase könnte durch die schnelle, reversible homologe Desensibilisierung des GLP-1-Rezeptors bedingt sein, die durch höhere Konzentrationen von GLP-1 selbst ausgelöst wird, beginnend innerhalb von 5 Minuten [Fehmann et al., 1991a]. Bei der Höhe des initialen Calciumanstiegs, der bei den hier durchgeführten Messungen für die Berechnungen verwendet wurde, sollte dies somit keine Auswirkungen auf die Gesamtaussage haben.

4.1.1 Effekt von KT5720 auf die GLP-1-vermittelte Calciumerhöhung und Membrandepolarisation

KT5720 (siehe Abbildung 2.6) ist ein spezifischer Hemmstoff der Proteinkinase A als weiter entwickeltes Derivat der K252-Gruppe, welches wegen seiner guten Membrangängigkeit besonders bei intakten Zellen geeignet ist. In vitro liegt die Konzentration, die zur halbmaximalen Hemmung (K_i) der Proteinkinase A führt, bei

60nM gegenüber mehr als 2000nM bei Proteinkinase C oder G. In verschiedenen Zellstudien wurde mit Konzentrationen zwischen 0,1 μ M und 10 μ M KT5720 dosisabhängig eine ausgeprägte Inhibition von intrazellulären Proteinkinase-A-abhängigen Prozessen nachgewiesen. Bei höheren Konzentrationen, wie 10 μ M und 50 μ M KT5720, könnte entsprechend der verschiedenen K_I die Spezifität für die Proteinkinase A verloren gehen [Marquardt et al., 1994; Yoshida et al., 1992].

In den Experimenten dieser Arbeit zeigte KT5720 an den INS-1-Zellen bei Konzentrationen zwischen 1 μ M und 10 μ M, also ausreichenden Dosen, keine Hemmung der Forskolin bzw. cAMP-induzierten zytosolischen Calciumerhöhung bei den INS-1-Zellen (Abbildung 3.6). In den Versuchen mit Langerhansschen Inseln fand sich ebenfalls nach 10 bis 15 minütiger Inkubation mit 10 und 20 μ M KT5270 keine eindeutige hemmende Wirkung von KT5720 auf den Forskolineffekt (Abbildung 3.8).

Genau wie bezüglich des Calciumspiegels kam es unter 5 μ M KT5720 zu einer unverändert deutlichen Depolarisation der INS-1-Zellen durch Forskolin in den Messungen mit Bisoxonol (Abbildung 3.7).

Bei den hier aufgeführten Experimenten konnte somit keine Inhibition durch den spezifischen Proteinkinase A-Hemmstoff KT5720 auf den cAMP-vermittelten Effekt nachgewiesen werden. Um eine genaue Aussage über die Beteiligung von Proteinkinase A an der Signaltransduktion von GLP-1 machen zu können, sollte aber nicht nur ein Inhibitor einbezogen werden.

4.1.2 Effekt von Rp-cAMPs auf die GLP-1-vermittelte Calciumerhöhung und Membrandepolarisation

Als zweiter Hemmstoff wurde Rp-cAMPs (siehe Abbildung 2.7) verwendet. Das Rp-diastereomere Phosphothioat-Derivat konkurriert mit cAMP um die Bindung an der Proteinkinase A und ist ein spezifischer Inhibitor. Die benötigten Rp-cAMPs Konzentrationen hängen von verschiedenen Faktoren ab. Die halbmaximale Inhibition (K_I) liegt in vitro bei 8,3 μ M und in intakten Hepatozyten zwischen 1-10 μ M. Rp-cAMPs hemmt zum Beispiel die Proteinkinase A-abhängige Glukagon-induzierte Glukosesekretion bei Hepatozyten mit einer K_I von 3 μ M. Eine weitere Vergrößerung der Konzentration von 30 auf 300 μ M erbrachte keinen weiteren Effekt. Wegen der

hydrophilen Eigenschaft und der schlechten Membrangängigkeit wurde eine ausreichende Inkubationszeit von 15 Minuten berücksichtigt [Parker Botelho et al., 1988a; Rothermel et al., 1984a].

Bei den INS-1-Zellen hatte eine 15-20 minütige Inkubation mit 1mM Rp-cAMPs, also einer deutlich höhere Dosis als oben beschrieben, keinen Einfluss auf die Forskolin-vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Abbildung 3.9). An den Langerhansschen Inseln erbrachte eine Superfusion von 500µM Rp-cAMPs weder sichere Hemmung des GLP-1- noch des Forskolin-bedingten Calciumanstiegs (Abbildung 3.12 und 3.13). Die fehlende Inhibition durch Rp-cAMPs kann jedoch nicht Folge einer mangelnden Konzentration, einer fehlenden Penetration durch die Zellmembran oder einer zu kurzen Inkubationszeit sein, da das aktive Diastereomer Sp-cAMPs in gleicher Konzentration (500µM) schon innerhalb von 160 Sekunden mit einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration einher ging (Abbildung 3.14).

Die Erhöhung des Calciumspiegels durch Sp-cAMPs lässt jedoch noch keine Rückschlüsse über eine Beteiligung von Proteinkinase A zu, da Sp-cAMPs auch als unspezifischer Agonist von cAMP angesehen werden kann, der auch andere cAMP-vermittelten Effekte weitergeben könnte. Wenn die Forskolin- und GLP-1-vermittelte cAMP-Erhöhung die Calciumerhöhung nicht über die Proteinkinase A weiter gibt, könnte ein allgemeiner cAMP-Agonist dies ebenso Proteinkinase-A-unabhängig machen. Eine Zufuhr von Forskolin oder GLP-1 zu einer bestehenden Sp-cAMPs-Gabe führte hier zu einem weiteren Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (siehe Abbildung 3.15). Vorbeschrieben ist für Sp-cAMPs bei der cAMP-abhängigen Proteinkinase zumindest eine niedrigere Affinität gegenüber cAMP selbst [Van Haastert et al., 1984; Dostmann et al., 1990]. Sp-cAMPs könnte eine schwächere Aktion am gleichen Ort wie bei einer globalen cAMP-Erhöhung durch Forskolin bzw. GLP-1 auslösen, so dass Raum für eine weitere Steigerung der Calciumkonzentration durch cAMP bliebe. Genauso könnte aber Sp-cAMPs auf einem vollständig anderen Wege oder an einem anderen Punkt der Proteinkinase A seine Wirkung vermitteln. Entscheidend ist jedoch, dass durch Sp-cAMPs eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels schnell und signifikant dargestellt werden konnte und hierdurch Rückschlüsse auf die Penetration von Rp-cAMPs in die Zelle gezogen werden können.

Höhere Konzentrationen von Rp-cAMPs, wie 3mM, bewirkten zudem Veränderungen der Glukose-induzierten Calciumoszillationen, indem sie unter anderem die Amplitude der Oszillationen verringerten (Abbildung 3.11).

Eine Beteiligung von Proteinkinase A an den rein Glukose-induzierte Oszillationen ist nicht gesichert, aber nach dem folgenden Modell über die Entstehung der Oszillationen wenig wahrscheinlich. Modellhaft findet sich die Glukose-induzierte, erhöhte Calciumkonzentration auch in den Mitochondrien wieder, wobei es anfangs zu einer Verstärkung des Metabolismus mit erhöhtem Sauerstoffverbrauch kommt, gefolgt von einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials und einer Erniedrigung der ATP-Produktion. Daneben könnte das erhöhte zytosolische Calcium die Glykolyse und darüber die ATP-Erzeugung hemmen. Dies wird jedoch kontrovers diskutiert, da in der NAD(P)H-Fluoreszenz kein Oszillieren nachweisbar ist. Durch die Erniedrigung des ATP/ADP-Quotienten können die K_{ATP} -Kanäle öffnen und die Zellmembran repolarisieren, was wiederum die VDCCs schließt. Mit erniedrigter intrazellulärer Calciumkonzentration kann erneut vermehrt ATP gebildet werden [Kennedy et al., 2002; Gilon et al., 1992].

Bei dem hier beschriebenen Effekt von Rp-cAMPs handelt es sich auch in Anbetracht der hohen Konzentration möglicherweise um einen unspezifischen Nebeneffekt, zumal Rp-cAMPs selbst keinen Einfluss auf das Membranpotential hatte.

Auch die cAMP-induzierte Membrandepolarisation durch Forskolin blieb in den INS-1-Zellen nach 30 minütiger Inkubation mit 200 μ M Rp-cAMPs unverändert (Abbildung 3.10).

Nach der fehlenden Wirkung von KT5720 zeigen auch die Versuche mit dem spezifischen Proteinkinase-A-Hemmstoff Rp-cAMPs insgesamt, dass trotz ausreichender Konzentration und Inkubation keine Inhibition der GLP-1- bzw. cAMP-bedingten Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration und der Membrandepolarisation erreicht wurde.

4.1.3 Effekt von H-89 auf die GLP-1-vermittelte Calciumerhöhung und Membrandepolarisation

Mit einem dritten spezifischen Proteinkinase A-Hemmstoff, H-89 (siehe Abbildung 2.8), sollte die fehlende Beteiligung von Proteinkinase A an diesen Prozessen weiter bestätigt werden. H-89 hat gegenüber Proteinkinase A eine K_i von 40nM und ist somit der potenteste hier verwendete Inhibitor. Einzig hinderlich in seiner Beurteilung ist eine K_i gegenüber Proteinkinase G von 0,34 μ M und gegenüber der ROCK-II von 0,27 μ M. Die K_i ist zwar größer, es könnte aber möglicherweise eine Beeinflussung dieser Proteinkinasen bestehen, so dass H-89, wie in dieser Arbeit, nicht als einziger Indikator für die Beteiligung von Proteinkinase A verwendet werden sollte [Hidaka et al., 1991; Leemhuis et al., 2002]. Es wurde aber gezeigt, dass H-89 bei einer Konzentration von 10 μ M noch selektiv die Proteinkinase A gegenüber der Proteinkinase G hemmt [Schubert et al., 1997]. Viele in der Literatur aufgeführte Versuche zeigen, dass durch H-89 auch schon in Konzentrationen zwischen 0,05 μ M und 0,5 μ M die Proteinkinase A-Aktivität in verschiedenen Zellarten ausreichend inhibiert wird. So werden zumeist Konzentrationen von 10 μ M oder weniger verwendet [Asokanathan et al., 1996; Shintani et al., 1996; Kato 1996; Yang et al., 1996].

In den Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration zeigte sich, dass bei den INS-1-Zellen eine Inkubation mit 2 und 5 μ M H-89 keine signifikante Hemmung des GLP-1-Effektes bewirkte. Erst bei höheren Konzentrationen mit 10 und 20 μ M schien H-89 den GLP-1-induzierten Calciumanstieg deutlich zu verringern (Abbildung 3.17). Auch bei den Langerhansschen Inseln wurde durch H-89, ebenfalls mit höheren Konzentrationen von 20 und 40 μ M und vor allem bei längerer Inkubationsdauer, die Wirkung von GLP-1 und Forskolin deutlich reduziert (Abbildung 3.20 und 3.21). Die Forskolin-induzierte Membrandepolarisation der INS-1-Zellen wurde ebenfalls unter hohen Konzentrationen H-89 (10 μ M) verringert (Abbildung 3.18).

Zu beachten ist dabei allerdings, dass H-89 selbst dosisabhängig einen großen Abfall in der gemessenen Calciumkonzentration bewirkte, der die Relationen der cAMP-bedingten Calciumerhöhung verfälschen könnte (Abbildung 3.16 und 3.19). Bezogen auf die relative Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels in Relation zum Glukose-induzierten Anstieg bewirkte H-89 bei 20 μ M und sogar bei 40 μ M keine signifikante

Veränderung. Erst bei 40-minütiger Inkubation mit 40 μ M schon unter 3mM Glukose war die Inhibition signifikant (Abbildung 3.22). Bei dieser Konzentration wurde allerdings auch schon die Glukose-induzierte Vergrößerung der Calciumkonzentration auf 44nM reduziert, gegenüber 280nM in der Kontrolle. Der Glukose-induzierte Anstieg des zytosolischen Calciumspiegels entsteht wie oben (Kapitel 1.1 und 4.1) beschrieben durch Verschiebung des ATP/ADP-Quotienten, Schluss der K_{ATP} -Kanäle, Depolarisation und Öffnung der L-Typ VDCCs. Die Proteinkinase A hat in diesem Glukose-bedingten Prozess keine zentrale Rolle, weder beim Schluss der K_{ATP} -Kanäle noch bezüglich des Calciumstroms durch die VDCCs [Ashcroft et al., 1989; Gromada et al., 1997].

Vielmehr sprechen 1.) die hohen notwendigen Konzentrationen, bei denen auch keine sichere Selektivität gegenüber der Proteinkinase A mehr gewährleistet ist, 2.) die lange Inkubationsdauer und 3.) die parallel auftretenden von Proteinkinase A unabhängigen Änderungen der Glukose-induzierten Calciumerhöhung dafür, dass die durch H-89 auftretenden Änderungen nicht auf eine Beteiligung der Proteinkinase A, sondern vielmehr durch mehr oder weniger unspezifische Wirkungen zustande kommen. H-89 könnte primär die Glukose-induzierte Calciumerhöhung hemmen und so sekundär den cAMP-Effekt verändern.

Insgesamt konnte somit unter Verwendung der drei verschiedenen, spezifischen Hemmstoffe KT5720, Rp-cAMPs und H-89 eine Beteiligung der Proteinkinase A sowohl an der GLP-1 bzw. cAMP-induzierten Membrandepolarisation sowie der GLP-1 bzw. cAMP-abhängigen Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels an INS-1-Zellen und β -Zellen der Langerhansschen Inseln der Maus ausgeschlossen werden.

4.2 Interpretation der Ergebnisse der Tyrosinkinase-Hemmstoffe

Die Tyrosinphosphorylierung ist ein wichtiger Mechanismus in der Signaltransduktion. Allerdings ist die Rolle, die Tyrosinkinasen in der Regulierung sowohl der Glukose-induzierten als auch der GLP-1-bedingten Insulinsekretion der β -Zellen spielt, nicht geklärt. Anhand zweier gebräuchlicher Tyrosinkinasehemmstoffe, Genistein und Herbimycin A, wird der Einfluss von Tyrosinkinasen auf die durch GLP-

1 bzw. cAMP-induzierte Vergrößerung der Insulinsekretion durch Messung des zytosolischen Calciumspiegels und der Membrandepolarisation bewertet.

4.2.1 Effekt von Genistein auf die GLP-1-vermittelte Calciumerhöhung und Membrandepolarisation

Das Isoflavon Genistein ist ein oft verwendeter Hemmstoff für die verschiedenen Tyrosinkinasen. Es inhibiert vor allem Rezeptortyrosinkinasen, wie den EGF-Rezeptor, aber auch nicht rezeptorgebundene Tyrosinkinasen wie die pp60^{v-src} [Akiyama et al., 1987]. Je nach der jeweiligen Tyrosinkinase wurden in vitro unterschiedliche halbmaximale Hemmkonzentrationen ermittelt. In der Literatur werden zur Inhibition intrazellulärer Tyrosinkinaseaktivität zumeist Konzentrationen bis 100µM verwendet [Hool et al., 1998; Jonas et al., 1996; Sorenson et al., 1994]. Auch wenn es bezüglich der Wirkung bei verschiedenen Konzentrationen, wie unten diskutiert, unterschiedliche Aussagen gibt.

In Anbetracht der deutlichen Veränderung die Genistein selbst auf die intrazelluläre Calciumkonzentration unter 10mM bzw. 11mM Glukose bei den INS-1 und β-Zellen der Langerhansschen Insel der Maus verursachte, soll zunächst die bisherige Datenlage über die Wirkung von Tyrosinkinasen auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion betrachtet werden.

Bei beiden Zelltypen führte Genistein dosisabhängig zu einem deutlichen Abfall der zytosolischen Calciumkonzentration. Bei den INS-1-Zellen ist der Abfall schon bei 5µM deutlich zu sehen, während dies bei den Inselzellen ab 50µM beobachtet wurden. Die Reduktion der zytosolischen Calciumkonzentration der β-Zellen war so massiv, dass er auf dem Niveau lag, auf dem der Calciumspiegel bei 3mM Glukose zu Versuchsbeginn war. Der gesamte Glukose-induzierte Calciumanstieg schien somit durch Genistein (50-100µM) aufgehoben zu werden. An den β-Zellen der Inseln konnten aber auch in kleineren Konzentrationen Änderungen des Oszillationsverhalten festgestellt werden, in dem Sinn, dass die Amplitude niedriger, die Frequenz höher wurde. Größere Genisteinkonzentrationen unterdrückten die Oszillationen vollständig, aber reversibel (Abbildungen 3.23, 3.27-29). Eine deutliche Beeinflussung der Glukose-

induzierten Insulinsekretion durch Genistein ist somit wahrscheinlich. Die Art dieser Einflussnahme wird unterschiedlich, zum Teil kontrovers, diskutiert.

Im Widerspruch zu den hier aufgeführten Versuchen ist für Genistein zum Beispiel an Langerhansschen Inseln der Ratte eine dosisabhängig Erhöhung der Insulinsekretion mit einem Maximum bei $100\mu\text{M}$ und einer ED_{50} bei $20\mu\text{M}$ beschrieben, wohingegen die Zellproliferation bei diesen Konzentrationen deutlich abnahm [Sorenson et al., 1994]. Auch bei der INS-1-Zelllinie wurde eine Steigerung der Glukose-induzierten Insulinsekretion durch Genistein bis $100\mu\text{M}$ beobachtet. Größere Genisteinkonzentrationen wie $500\mu\text{M}$ hingegen hemmten die Insulinsekretion. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Genistein das negative Feedback, welches Insulin über den Insulinrezeptor, bewirkt, zu verhindern scheint. Der Insulinrezeptor ist bekanntermaßen eng mit Tyrosinkinaseaktivität verbunden. Eine Veränderung des kleinen Glukose-bedingten cAMP-Anstiegs ist nicht aufgefallen [Verspohl et al., 1995].

Eine Arbeitsgruppe um Jonas et al. [1995] fand ähnliche Ergebnisse an Mäuseinseln. Paradoxerweise zeigte sich in den Versuchen gegensätzlich zur Erhöhung der Insulinsekretion eine Abnahme des Calciumeinstroms in die Zelle sowie eine Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration. Daidzein, das bzgl. den Tyrosinkinasen ineffektive Analog von Genistein, führte in dieser Versuchsreihe interessanterweise ebenfalls zu einer erhöhten Insulinsekretion, ließ aber die Calciumkonzentration nahezu unbeeinflusst [Jonas et al., 1995]. Man könnte daraus schließen, dass die erhöhte Insulinsekretion eher ein von Tyrosinkinasen unabhängiger Vorgang ist, während die Erniedrigung der Calciumkonzentration, die auch in den Versuchen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, auf eine Hemmung durch Tyrosinkinasen zurückzuführen ist.

Zu beachten ist auch, dass der Tyrosinkinasehemmstoff Genistein vor allem in höheren Konzentrationen deutliche Nebeneffekte auf den Zellstoffwechsel haben kann. Er soll zum Beispiel den Pyruvattransport in das Mitochondrium oder die Aktivität der Atmungskette reduzieren. Als Richtwert hierfür wurde eine Reduktion der Sauerstoffaufnahme um 60% durch $200\mu\text{M}$ Genistein angegeben. Bezüglich des Laktattransports wird sogar eine sehr niedrige K_i von $8,5\mu\text{M}$ erwähnt. Weiterhin könnte Genistein schon die ersten Schritte des Glukosestoffwechsels verändern, da zumindest für den Hexosetransporter GLUT1 eine Hemmung (K_i bei $12\mu\text{M}$) durch Genistein

beschrieben ist. Bei Genisteinkonzentrationen von 100 μ M können dementsprechend Verringerungen des ATP-Levels in der Zelle nicht ausgeschlossen werden. Demgegenüber wurde allerdings auch beschrieben, dass in isolierten Fettzellen Genistein keinen Einfluss auf den ATP-Spiegel hat. Die Inhibition der Insulinsekretion bei höheren Konzentrationen wurde von den Autoren auf toxische Einflüsse zurückgeführt [Verspohl et al., 1995; Vera et al., 1996; Young et al., 1993].

Persaud et al. dagegen hielt die vergrößerte Insulinsekretion der niedrigen Genisteinkonzentrationen für einen Nebeneffekt und wertete die Inhibition bei höheren Genisteinspiegeln (500 μ M) als realen Tyrosinkinaseeffekt, da in den Versuchen dieser Arbeitsgruppe keine Beeinflussung des Glukosestoffwechsels nachweisbar war. Genistein konnte hier neben den Glukose-bedingten Wirkungen auch den durch Sulfonylharnstoffe ausgelösten Effekt vollständig verhindern. Die Insulinsekretion bei hohen Calciumkonzentration bei permeabilisierten β -Zellen aus Langerhansschen Inseln der Ratte ließ sich jedoch nicht durch Tyrosinkinasehemmstoffe ändern. Die Autoren gingen davon aus, dass Tyrosinphosphorylierung eines regulativen Proteins zwischen diesen beiden Ereignissen, wie zum Beispiel die des VDCC's, für die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung förderlich ist. Kongruent hierzu besitzt die alpha-Untereinheit des VDCCs viele Tyrosinreste. Genistein könnte den Calciumeinstrom durch die VDCCs hemmen und so die intrazelluläre Calciumkonzentration erniedrigen. Eine erhöhte Phosphorylierung durch Tyrosinkinasen per se sei jedoch für die Glukose-induzierte Insulinsekretion nicht notwendig [Persaud et al., 1999; Jonas et al., 1995].

Hohe Konzentrationen haben weiterhin den Nachteil, dass Genistein seine Selektivität gegenüber den Tyrosinkinasen verliert, da bei 500 μ M Genistein die Proteinkinase C gehemmt wird [Akiyama et al., 1987; Persaud et al. 1999]

An dieser Kontroverse ist erkennbar, dass bei Genistein die Glukose-induzierten Effekte wie Erhöhung der Calciumkonzentration oder die Calciumoszillationen auf verschiedene Wege beurteilt werden können. So könnte zum Beispiel eine Genistein-bedingte Reduktion des ATP/ADP-Quotienten infolge einer von der eigentlichen Tyrosinkinasewirkung unabhängigen Hemmung der Atmungskette das Verhalten im Bezug auf Calcium ebenso verändern wie eine Reduktion des Calciumstroms durch die VDCCs infolge einer Inhibition der Tyrosinphosphorylierung. Gegen die Hemmung der Atmungskette bzw. einer Änderung des ATP/ADP-Quotienten in den hier aufgeführten Versuchen spricht zumindest in gewissem Maße, dass durch 10-50 μ M Genistein bei

10mM Glukose in den Bisoxonolmessungen das Membranpotential nicht eindeutig bzw. nicht signifikant verändert wurde (siehe Abbildung 3.25 und 3.26).

Sicherlich sind weitere Untersuchungen vor allem mit selektiveren und weniger nebenwirkungsreichen Tyrosinkinasehemmstoffen notwendig, um die Effekte von Tyrosinkinasen auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion ausreichend beurteilen und differenzieren zu können.

In Anbetracht dieser Kontroverse müssen nun die Auswirkungen von Genistein auf die GLP-1 bedingte Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration und Membrandepolarisation vorsichtig gewertet werden. Hier wurden, wie überwiegend in der Literatur, Konzentrationen bis 100 μ M Genistein verwendet [Hool et al., 1998; Jonas et al., 1996; Sorenson et al., 1994].

An den Ins-1-Zellen führte Genistein entsprechend der starken Reduktion der Glukose-bedingten zytosolischen Calciumkonzentration auch zu einer deutlichen Erniedrigung des Forskolin-induzierten Calciumerhöhung. Der Calciumanstieg ließ sich jedoch selbst mit Konzentrationen von 100 μ M Genistein nicht vollständig unterdrücken und nahm vielmehr zwischen 50 und 100 μ M Genistein nicht weiter zu (Abbildung 3.24). Bei den Langerhansschen Inseln der Maus stellte sich dies ähnlich eindrücklich dar. Genistein führte bei 100 μ M zu einem Absinken der intrazellulären Calciumkonzentration auf ein Niveau ähnlich dem nicht stimulierten Zustand der Zelle (Abbildung 3.28 und 3.29). Dieses Ergebnis könnte zum Beispiel im Bezug auf die oben geäußerte Theorie von Persaud et al. interpretiert werden, wenngleich diese Arbeitsgruppe deutlich höhere Genisteinkonzentrationen verwendeten. Eine Hemmung der VDCCs durch Genistein würde den Calciumeinstrom in die Zelle verhindern und somit die Reduktion des Calciumspiegels auf basale Werte erklären. Nicht desto trotz führten GLP-1 und Forskolin zu einem kleinen, aber deutlich sichtbaren Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration. In Hinblick auf die starke Inhibition der Glukose-induzierten Effekte durch Genistein ist somit eine Beteiligung von Tyrosinkinasen bei der GLP-1 bzw. cAMP-bedingten intrazellulären Calciumerhöhung wenig wahrscheinlich. Sicher ausgeschlossen kann sie jedoch wegen des deutlichen, primären Einflusses auf die Glukose-induzierten Calciumerhöhung nicht.

Bezüglich des Membranpotentials bewirkte Genistein bis 50 μ M selbst keine reproduzierbare Änderung (Abbildungen 3.25, 3.26). Wie schon oben aufgeführt, spricht dies gegen eine signifikante negative Beeinflussung der Atmungskette mit nachfolgender Änderung des ATP/ADP-Gehalts zumindest bezüglich der Glukose-induzierten Effekte in den hier aufgeführten Versuchen. Erst in hohen Konzentrationen um 100 μ M Genistein, nicht dem gegenüber bei 50 μ M, konnte eine sichtliche Reduktion der GLP-1 bzw. Forskolin-induzierten Membrandepolarisation nachgewiesen werden. Eine vollständige Unterdrückung der Membrandepolarisierung ließ sich jedoch nicht bewirken. Das als negative Kontrolle verwendete, gegenüber Tyrosinkinasen weitestgehend inaktive Isoflavon Daidzein hat, in gleicher Konzentration, ebenfalls einen kleinen inhibitorischen Effekt (Abbildung 3.25), was eher für einen unspezifischen Mechanismus als für eine Beteiligung von Tyrosinkinasen spricht.

Insgesamt sind die Ergebnisse von Genistein in Anbetracht der starken bzw. vollständigen Inhibition der Glukose-induzierten Effekte in Form einer Calciumerniedrigung schwierig zu interpretieren, eine zusätzliche Hemmung des GLP-1-Effektes in Bezug auf den zytosolischen Calciumspiegel und das Membranpotential ist wenig wahrscheinlich, kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden.

4.2.2 Effekt von Herbimycin A auf die GLP-1-vermittelte Calciumerhöhung und Membrandepolarisation

Mit Herbimycin A, als zweitem Tyrosinkinasehemmstoff, soll Klarheit in die schwierige Datenlage nach der Untersuchung von Genistein gebracht werden. Herbimycin A ist ein gebräuchlicher Tyrosinkinaseinhibitor, der sowohl Rezeptortyrosinkinasen wie zytoplasmatische Tyrosinkinase, z. B. der src-Familie, hemmt. Die in der Literatur verwendeten Konzentrationen liegen zumeist bei 1 μ M, zum Teil auch bis zu 10 μ M [Della Rocca et al., 1999; Ogata et al., 2003; Satoh et al., 1992; Sepp-Lorenzino et al., 1995].

Wie schon zuvor Genistein, senkte Herbimycin A bei den INS-1-Zellen den Langerhansschen Inseln konzentrationsabhängig den zytosolischen Calciumspiegel,

wenn auch in geringerem Ausmaß als Genistein (Abbildung 3.30). Dies könnte erneut mit einem Einfluss von Tyrosinkinasen auf die Glukose-induzierten Effekte zu tun haben. Dementsprechend reduzierte sich, ebenfalls in kleinerem Maße als bei Genistein, die Forskolin-induzierten Calciumerhöhung in Abhängigkeit von der Dosis des Herbimycins. Es ließ sich jedoch bei den INS-1-Zellen auch noch bei wesentlich höheren Konzentrationen (20 μ M) als sonst in der Literatur verwendet ein deutlicher Anstieg der Calciumkonzentration durch Forskolin bewirken. Bei den Langerhansschen Inseln führten 10 μ M Herbimycin nur zu einer geringe, insignifikanten Reduktion der Forskolinwirkung, wohingegen in der Literatur bereits 1 μ M Herbimycin A zu einer signifikanten Inhibition der Tyrosinkinaseaktivitäten geführt hatte [Della Rocca et al., 1999]. Gleiches gilt für die Membranpotentialmessungen, bei denen immerhin 5 μ M Herbimycin A keine und selbst 10 μ M nur eine leicht Reduktion der Forskolin-bedingten Depolarisation bewirkten konnten (Abbildung 3.30-3.33).

Insgesamt bestätigen die Versuche mit Herbimycin A die Ergebnisse und Rückschlüsse, die bei Genistein diskutiert wurden. So ist es nach den hier aufgeführten Ergebnissen wenig wahrscheinlich, dass Tyrosinkinasen entscheidend an der GLP-1 bzw. cAMP-induzierten Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration oder der Membrandepolarisation beteiligt sind. Vielmehr lassen die Resultate sich darauf zurückführen, dass Tyrosinkinasen in die Glukose-induzierten Insulinsekretion mit Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration oder der Membrandepolarisation eingebunden sind.

4.3 Interpretation der Ergebnisse von Staurosporin als unselektivem Protein-kinasehemmstoff

Zusätzlich zu den spezifischen Hemmstoffen der Proteinkinase A und der Tyrosinkinasen, bei denen sich keine Beteiligung der entsprechenden Proteinkinase an der GLP-1-bedingten zytosolischen Calciumerhöhung und Membrandepolarisation hat nachweisen lassen, wurde mit Staurosporin ein sehr potenter, aber unselektiver Inhibitor für Proteinkinasen verwendet. Die stärkste Hemmung hat Staurosporin gegenüber der Proteinkinase C mit einer K_I von 3nM. Ähnlich stark (K_I 6-8nM) werden aber auch

Proteinkinase A, Proteinkinase G und die Tyrosinkinase p60v^{src} inhibiert [Rüegg et al., 1989]. Entsprechend sind niedrige Konzentrationen zur Inhibition der Proteinkinasen notwendig. So wird die Proteinkinase C oder die Autophosphorylierung des PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor) bereits bei 0,1µM Staurosporin fast vollständig blockiert [Rüegg et al., 1989 Secrist et al., 1990]. Bei hohen Konzentrationen kann durch die vielfältige Wirkung von Staurosporin auch ein Einfluss auf den Zellmetabolismus nicht ausgeschlossen werden, da zum Beispiel für eine Konzentration von 1µM eine Hemmung der Glutamat/Malat-Oxidation von 80% beschrieben worden ist [Young et al., 1993].

Staurosporin konnte in den hier dargestellten Versuchen die GLP-1-induzierte Erhöhung der zytosolischen Calciumerhöhung des INS-1-Zellen erst ab Konzentrationen über 500nM deutlich hemmen, zwischen 50 und 500nM hingegen zeigte sich lediglich ein kleiner, nicht signifikanter Effekt. Selbst mit 1 bzw. 2µM Staurosporin konnte der GLP-1 und Forskolin-induzierte Calciumanstieg nicht vollständig unterdrückt werden (Abbildung 3.35). Bei den Langerhansschen Inseln ließ sich eine Inhibition erst nach langer Inkubation mit hohen Staurosporinkonzentrationen bewirken. 500nM Staurosporin konnte keine Reduktion der GLP-1-Wirkung herbeiführen und selbst bei 2 bzw. 5µM Staurosporin war eine lange Inkubationszeit notwendig bis es zu einer Erniedrigung der cAMP-bedingten Calciumerhöhung kam (Abbildung 3.39 und 3.40).

Wie schon zuvor bei den spezifischen Hemmstoffen, vor allem H-89 und Genistein, bewirkte Staurosporin insbesondere in den Konzentrationshöhen, bei denen sich auch die GLP-1- bzw. Forskolin-bedingten Effekte verminderten, eine deutliche Beeinflussung der Glukose-induzierten Erhöhung der Calciumkonzentration sowie der Glukose-induzierten Oszillationen (Abbildung 3.39 und 3.40).

Ebenso fand sich bei den Messungen des Membranpotentials unter 200nM Staurosporin eine weiterhin gut erhaltene Depolarisation durch Forskolin bzw. dem cAMP-Analog cpt-cAMPs. Erst 1µM Staurosporin konnte diese Wirkung nahezu vollständig verhindern (Abbildung 3.36 und 3.37).

Insgesamt muss also entsprechend der hohen benötigten Staurosporinkonzentrationen und der darunter ebenfalls auftretenden Veränderungen der Glukose-induzierten Effekte davon ausgegangen werden, dass es sich hier entweder um unspezifischen Wirkungen

handelt oder um Effekte, die sich über die Beeinflussung von Glukose-induzierten Prozessen, nicht aber über eine direkte spezifische Proteinkinasehemmung des GLP-1-Effektes erklären lassen.

Im Gegensatz hierzu konnte an perfundierten Langerhansschen Inseln der Ratte gezeigt werden, dass bereits 20nM Staurosporin, also deutlich unter den hier verwendeten Dosen, die GLP-1-induzierte Steigerung der Glukose-abhängigen Insulinsekretion vollständig unterdrückten [Zawalich et al., 1993].

Die Einordnung dieser Feststellung in die hier erzielten Resultate erfolgt in den folgenden Abschnitten, in dem die bisherige Literatur in Hinblick auf die hier erzielten Ergebnisse bewertet werden soll.

4.4 Schlussfolgerungen für die mögliche Mechanismen der Calcium-abhängigen Signaltransduktion von Glucagon-like Peptide 1(7-36)amid in Insulin-sezernierenden Zellen des endokrinen Pankreas

Insgesamt zeigen die hier aufgeführten Versuche, dass an der GLP-1 bzw. cAMP-induzierten Glukose-abhängigen Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration und Membrandepolarisation weder Proteinkinase A noch Tyrosinkinasen entscheidend beteiligt sind. Die fehlende Wirkung des unspezifischen Proteinkinasehemmstoffes Staurosporin auch in hohen Konzentration lässt vielmehr vermuten, dass an diesem speziellen GLP-1-Effekt gar keine Proteinkinase beteiligt ist. Im folgenden sollen nun die hier erzielten Schlussfolgerungen anhand der bisher erschienen Literatur mit zum Teil sehr kontroverse Resultate eingeordnet werden, insbesondere im Bezug auf die verschiedenen Ionenkanäle und Mechanismen über die GLP-1 seine Wirkung entfalten könnte (siehe Abbildung 4.1).

4.4.1 Der ATP-abhängige Kaliumkanal

Der ATP-abhängige Kaliumkanal (K^+ _{ATP}-Kanal) der β -Zellen des endokrinen Pankreas besteht aus SUR1- und KIR6.2-Untereinheiten. An beiden dieser Anteile des

K^+ _{ATP}-Kanals konnten mögliche Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase A nachgewiesen werden [Aguilar-Bryan, 1995; Béguin et al., 1999]. So wurde vermutet, dass bei der Signaltransduktion von GLP-1 eine Proteinkinase A-abhängige Phosphorylierung dieser Kanals eine Rolle spielt.

Die Arbeitsgruppe um Holz et al. konnte an isolierten β -Zellen der Ratte nachweisen, dass 10 μ M Rp-cAMPs die synergistische Wirkung von GLP-1 und Glukose auf die Membrandepolarisation sowie den Kaliumstrom hemmt. Wegen der Selektivität von Rp-cAMPs wurde dieser GLP-1-Effekt der Proteinkinase A zugeschrieben. Die Versuche sind jedoch schwierig zu werten. Zum einen wurde Rp-cAMPs als einziger Hemmstoff verwendet, zum anderen waren die dabei verwendeten isolierten β -Zellen der Ratte unempfindlich für Glukose, da sie auf 10mM Glukose gar nicht oder nur kaum reagierten [Holz et al., 1993]. Somit scheinen diese Versuche zum Beispiel durch präparationsbedingte Artefakte nicht ausreichend bzw. ungeeignet, um den Einfluss der Proteinkinase A auf die Signaltransduktion von GLP-1 und den Kaliumkanal zu beurteilen. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte an β -Zellen der Maus eine Hemmung der GLP-1-induzierten Membrandepolarisation und des Kaliumstroms durch 100 μ M Rp-cAMPs. Allerdings wurden diese Versuche bei 5mM, also substimulativen Glukosekonzentrationen durchgeführt [Gromada et al., 1997]. Auch an INS-1-Zellen konnte bei niedriger Glukosekonzentration (5mM) eine Inhibition der GLP-1-bedingten Membrandepolarisation durch 1 μ M H-89 gezeigt werden. In der Arbeit wurde durch die katalytischen Untereinheit von Proteinkinase A der Kaliumstrom durch SUR1/KIR6.2 reduziert [Light et al., 2002]. Bei substimulativen Glukosespiegeln kann somit eine leichte Inhibition des K^+ _{ATP}-Kanal durch Proteinkinase A nicht ausgeschlossen werden. Ein Einfluss der Proteinkinase A an der Membrandepolarisation und so wahrscheinlich auch des K^+ _{ATP}-Kanals zumindest bei stimulativen Glukosekonzentrationen (10 bzw. 11mM) konnte durch die Ergebnisse der hier vorliegenden Versuche ausgeschlossen werden.

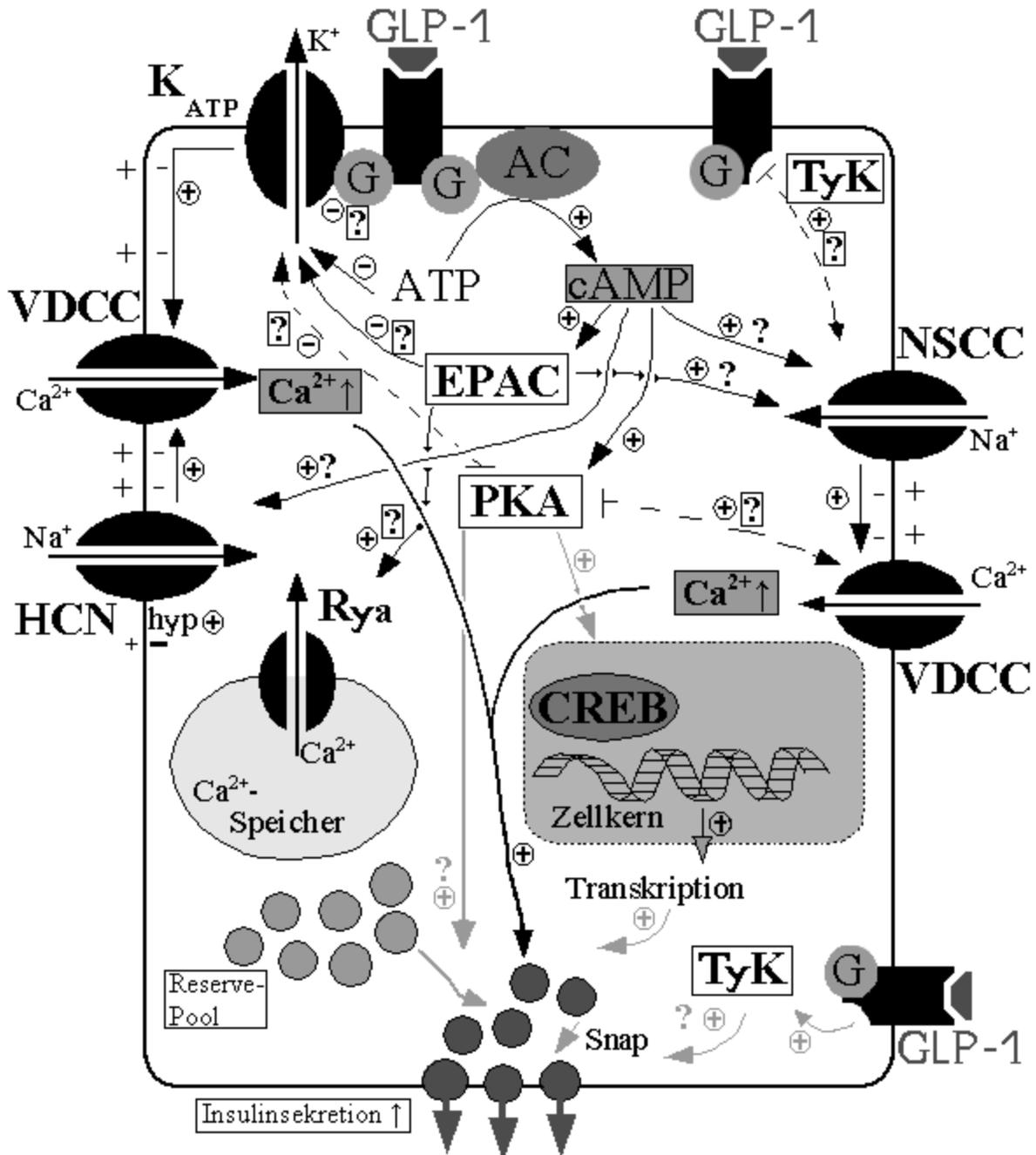


Abbildung 4.1: Signaltransduktion von GLP-1

GLP-1 bindet an den G-Protein-gekoppelt GLP-1-Rezeptor. Über die Adenylatzyklase wird cAMP gebildet. Die weiteren Schritte der Signaltransduktion werden zum Teil kontrovers diskutiert. GLP-1 führt unabhängig von Proteinkinase A und Tyrosinkinase (gestrichelte Pfeile wurde durch diese Arbeit widerlegt) zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die möglichen Wege sind dabei mit schwarzen Pfeilen markiert (? - möglich, aber noch nicht geklärt, ? - unwahrscheinlich). Der erhöhte Calciumspiegel führt zu einer gesteigerten Exozytose eines Teils der Insulingranula. GLP-1 kann aber auch unabhängig von Calcium, hier durch graue Pfeile markiert, die Insulinsekretion fördern. Inwieweit dabei Proteinkinase A oder die Tyrosinkinase beteiligt sind bleibt zu klären. Gesonderte Abkürzungen: Tyk – Tyrosinkinase; Rya – Ryanodin-abhängiger Calciumkanal

Gegen eine Beteiligung der Proteinkinase A an den K^+ _{ATP}-Kanal und zumindest in Teilen im Konsens mit den hier erzielten Ergebnissen spricht auch die Untersuchung von Arbeitsgruppe um Nakazaki et al., die keinen Effekt von je 5 μ M H-89 und KT5720 auf die GLP-1-induzierte Insulinfreisetzung an isolierten Mäuseinseln darstellen konnten. Jedoch zeigte sich eine signifikante Hemmung durch 100 μ M Rp-cAMPs, woraus diese Autoren schlossen, dass GLP-1 seinen Effekt auf den K^+ _{ATP}-Kanal unabhängig von Proteinkinase A unter Vermittlung des cAMP-regulierten Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors Epac ausübt [Nakazaki et al., 2002]. In dieser Arbeit wurde jedoch auch die späte Proteinkinase A-abhängige Phase der Insulinsekretion nicht durch H-89 und KT5720 reduziert, so dass eine mangelnde intrazellulär verfügbare Konzentrationen die fehlende Hemmung erklären könnte.

An β -Zellen der Ratte wurde beschrieben, dass es zu einer vollständig cAMP-unabhängige Hemmung des K^+ _{ATP}-Kanals kommt. Dabei wurde die GLP-1-bedingte Membrandepolarisation und der Kaliumstrom zwar durch den GLP-1-Antagonisten Exedine(9-39)amid, nicht jedoch durch Rp-cAMPs reduziert. Von den Autoren wurde dieser GLP-1-Effekt als eine Sensitivierung des K^+ _{ATP}-Kanal gegenüber ATP unabhängig von cAMP gewertet [Suga et al., 2000]. Eine Beteiligung von cAMP und Epac kann entsprechend nur geringen Hemmung von Epac durch Rp-cAMPs durch die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Daneben könnte, wie für das G_s -Protein des Glukagonrezeptors beschrieben, die $\beta\gamma$ -Untereinheit direkt ohne cAMP den Kaliumstrom hemmen [Ribalet et al., 1994]. Allerdings zeigten die hier aufgeführten Versuche mit Forskolin und somit cAMP dieselben Effekte wie mit GLP-1, so dass ein cAMP-unabhängige Wirkung direkt durch das G-Protein in diesem Fall unwahrscheinlich bzw. wenig relevant ist.

Kontrovers hierzu gibt es Literatur, die generell gegen einen Beteiligung des K^+ _{ATP}-Kanals am Effekt von GLP-1 und cAMP spricht [Britsch, et al., 1995; Yajima et al., 1999]. So konnten zum Beispiel Britsch et al. keinen sichere Wirkung von GLP-1 auf Ionenstrom durch den K^+ _{ATP}-Kanal in β -Zellen der Maus nachweisen und schloss daraus, dass die leichte Erhöhung der elektrischen Aktivität durch ein langsameres Schließen der spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanäle (VDCC) erfolgt [Britsch, et al., 1995]. Allerdings zeigten die β -Zellen in der Arbeit von Britsch insgesamt kaum einen Effekt

auf GLP-1, so dass die Ergebnisse auch andere, unter Umständen präparationsbedingte Ursachen haben könnten.

Henquin et al. berichteten hingegen anhand von Studien mit Forskolin schon 1984, dass an Langerhansschen Inseln der Maus Forskolin bzw. cAMP-Erhöhung Glukose-abhängig zu einer deutlichen Depolarisation führte, und zwar ohne Hemmung des Kaliumstroms [Henquin et al., 1984]. So erscheint eine Beteiligung des K^+ _{ATP}-Kanal an der Signaltransduktion von GLP-1 sehr fraglich.

4.4.2 Nicht selektive Kationenkanäle

GLP-1 könnte Einfluss auf andere Ionenkanäle in der Plasmamembran haben, die bei Aktivierung zu einer verstärkten Depolarisation mit nachfolgender Erhöhung der Calciumkonzentration führen. An den Insulinomzelllinien HIT-T15, β -TC6 sowie der seltener verwendeten CRI-G1 konnte ein durch GLP-1 und andere cAMP-Analoga induzierter Einwärtsstrom nachgewiesen werden, der in seinen Eigenschaften einem nicht selektiven Kationenkanal (NSCC) entspricht. Dieser von extrazellulärem Calcium und Natrium abhängiger Kanal bzw. Ionenstrom konnte nicht durch L-Typ-VDCC-spezifische Inhibitoren gehemmt werden und ließ sich mit Diazoxid nicht vollständig reduzieren. Die Öffnung solch eines NSCC fördert über einen Kationeneinwärtsstrom mit überwiegend Natriumionen die Depolarisation mit konsekutiver Eröffnung der VDCCs [Holz et al., 1995]. Ähnliche Effekte wie mit Sp-cAMPs konnten an diesem NSCC allerdings ebenso durch den cAMP-Antagonisten Rp-cAMPs ausgelöst werden. Entsprechend wurde eine cAMP-abhängige Aktivierung nicht über Proteinkinase A, sondern über eine oder mehrere unspezifische cAMP-Bindungsstellen diskutiert [Reale et al., 1994 und 1995; Holz et al., 1995]. Ein solcher cAMP-abhängiger, nicht von Proteinkinase A abhängiger unspezifischer Kationenkanal lässt sich gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbaren.

In der Literatur weiterhin beschrieben ist ein Maitotoxin-sensitiver, Calcium-abhängiger NSCC bei HIT-T15, β -TC6-Zellen, aber auch menschlichen Inseln, der durch GLP-1 und cAMP aktiviert wird. Bei diesem Maitotoxin-sensitiven NSCC ließ sich jedoch sowohl der Kationeneinwärtsstrom als auch die nachfolgende Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels durch 100 μ M Genistein hemmen, so dass den

Tyrosinkinasen eine modulierende Rolle bei der Vermittlung des GLP-1-Effektes zugesprochen wurde [Leech et al., 1997 und 1998]. Eine relevante Beteiligung von Tyrosinkinasen konnte dem gegenüber in den hier aufgeführten Versuchen nicht nachgewiesen werden. Vielmehr zeigten 100 μ M Genistein hier eine massive Reduktion der Glukose-abhängige Calciuserhöhung, die von den Autoren nicht beurteilt wurde.

Ein NSCC führt über den Kationeneinstrom bei Aktivierung zu einer verstärkten Depolarisation und kann nachfolgend eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirken und ist somit ein idealer Kandidat für die Vermittlung der GLP-1-Wirkung. Die Aktivierung diese Kanals ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit unabhängig von Proteinkinase A und Tyrosinkinasen und könnte zum Beispiel direkt über cAMP oder Epac erfolgen.

4.4.3 Der für zyklische Nukleotide sensitive, hyperpolarisationsaktivierte nicht selektive Kationenkanal HCN

In diesem Zusammenhang sollte zudem ein anderer nicht selektiver Kationenkanal erwähnt werden. Der für zyklische Nukleotide sensitive, hyperpolarisationsaktivierte nicht selektive Kationenkanal (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-sensitive cation non-selective channel – HCN) wurde mit verschiedenen Isoformen (1-4) in unterschiedlichen Gewebearten identifiziert, vor allem im Gehirn und Herz als Schrittmacher elektrischer Aktivität. Der Kanal wird zweiseitig zum einen spannungsabhängig durch eine Hyperpolarisation, zum anderen durch cAMP reguliert und hat dabei direkte Bindungsstellen für cAMP. Besonders bei HCN2 und HCN4 wird im cAMP-gebundenen Zustand die Schwelle für eine Aktivierung des Kanals in einen weniger hyperpolarisierten Bereich verschoben [Accili et al., 2002]. Auch in Langerhansschen Inseln konnte per PCR die Existenz von HCN2-Kanälen nachgewiesen werden [unveröffentlichte Daten, H.-P. Bode], so dass dieser Kanal ebenfalls in die Signaltransduktion von GLP-1 eingebunden sein könnte und so die Depolarisation vermittelt werden könnte.

4.4.4 Der L-Typ spannungsabhängige Calciumkanal

Ausgehend von der Tatsache, dass die Glukose-induzierte Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegel durch die L-Typ spannungsabhängigen Calciumkanäle (VDCC) vermittelt wird, wird auch ein Einfluss von GLP-1 in Abhängigkeit von cAMP bzw. Proteinkinase A auf diesen Kanal diskutiert [Suga et al., 1997; Yada et al., 1993, Lu et al., 1993].

So zeigte sich an β -Zellen der Ratte, dass die Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels induziert durch Dibutyryl-Adenosin 3',5'-zyklisches Monophosphat (db-cAMP), mit H-89 ebenso wie mit Nitrendipin reduziert wurde [Yaekura et al., 1996]. Trotz sehr hoher H-89-Konzentrationen (lange Inkubation mit 40 μ M), die auch die Glukose-induzierte Calciumantwort reduzierten, wurde dies als Beweis aufgeführt, dass der cAMP-bedingte Calciumanstieg abhängig von der Proteinkinase A ist [Yaekura et al., 1996]. Bei den hohen Konzentration von H-89, das zudem als einziger Proteinkinase-A-Hemmstoff verwendet wurde, lassen sich jedoch keine sicheren Rückschlüsse ziehen. An RINm5F-Zellen konnte eine Lokalisierung der GLP-1-bedingten Proteinkinase-A-Aktivität durch ein geklontes A-kinase Anchoring Proteins (AKAP18) nachgewiesen werden, das als Zielprotein der Proteinkinase A den Effekt an die Zellmembran und die L-Typ-VDCCs vermittelt. So bewirkt AKAP18 eine Modulation des Calciumkanals und eine Änderungen des zytosolischen Calciumspiegels [Fraser et al., 1998]. Die Eigenschaften von AKAP18 wurden in dieser Studie untersucht, indem AKAP18 zum Teil auf andere Zellen (HEK-293) übertragen wurde oder mit defekten AKAP18-Mutanten verglichen wurden. Eine Untersuchung mit spezifischen Hemmstoffen der Proteinkinase A fand nicht statt. Weiterhin ist zu bedenken, dass es sich bei der verwendeten RINm5F-Zelllinie um Glukose-unsensiblen Zellen handelt, die in ihren Eigenschaften deutlich von normalen β -Zellen abweichen. Ob AKAP18 somit bei den hier verwendeten Zellen eine Relevanz hat, bleibt unklar.

Diese Arbeiten, die eine Beteiligung von Proteinkinase A bei der Signaltransduktion von GLP-1 ausgehen, sind wie diskutiert unter anderem wegen des nicht vergleichbaren β -Zellmodells oder zu hohen Hemmstoffkonzentrationen insgesamt als nicht ausreichend für die Beurteilung einer Proteinkinase A-Beteiligung anzusehen. Sie stehen zudem im Gegensatz zu der Interpretation der hier aufgeführten Ergebnisse,

durch die sich keine Beteiligung von Proteinkinase A an der GLP-1- sowie cAMP-induzierten Calciumerhöhung feststellen ließ.

4.4.5 Die intrazellulären Calciumspeicher

Unabhängig von einer Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels infolge eines Einstroms aus dem Extrazellularraum könnten durch GLP-1 auch intrazelluläre Calciumspeicher entleeren und so die Calcium-bedingte Insulinfreisetzung erhöht werden.

An entfernteren, nicht Insulin-sezernierenden Zellen, den *Xenopus oocytes*, wurde beschrieben, dass der GLP-1-Rezeptor unabhängig von Proteinkinase A IP3-abhängig die intrazelluläre Calciumfreisetzung bewirkt [Gromada et al., 1998b]. Auch an der Affennierenzelllinie COS-7 führte GLP-1 über Aktivierung der Phospholipase C und IP3 zur Calciumerhöhung durch intrazelluläre Speicher. Die Anhebung der zytosolischen Calciumkonzentration war dabei im Gegensatz zu β -Zellen völlig unabhängig von VDCCs [Wheeler et al., 1993]. Die Versuche verwendeten jedoch alle keine β -Zellen oder Inseln. Bei β -Zellen der INS-1-Zelllinie und humanen Inseln selbst scheint die über den IP3-Rezeptor vermittelte Calciumerhöhung keine wesentliche Rolle zu spielen, da der Anstieg des Calciums nicht durch den IP3-Rezeptor-Antagonisten Xestospongin C reduziert werden konnte [Kang et al., 2001 und 2003].

An β TC3-Zellen wurde um 80% der Calciumerhöhung einem vom Ryanodinrezeptor abhängigen Weg zugeschrieben. Da sich diese Calciumerhöhung durch 10 μ M Rp-cAMPs vollständig blockieren ließ, gingen die Autoren von einer Proteinkinase-A-abhängigen Sensibilisierung zum Beispiel des Ryanodinrezeptors aus [Gromada et al., 1995]. In dieser Arbeit wurden jedoch keine Versuche mit Thapsigargin, einem Hemmstoff der Calcium-ATPase des endoplasmatischen Retikulums (SERCA), durchgeführt, so dass eine eindeutige Beteiligung von intrazellulären Calciumspeicher nicht bewiesen wurde.

Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass der initiale, transiente Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration von GLP-1 durch das Öffnen der intrazellulären Calciumspeicher ausgelöst wird. So konnte der Ryanodin-Rezeptor Typ 2 in den

verschiedensten β -Zelltypen inkl. humanen β -Zellen nachgewiesen werden. Bei Ratten- β -Zellen wurde die Mobilisierung dabei getriggert durch Calciumeinstrom über L-Typ VDCCs und schien, da durch $10\mu\text{M}$ Rp-cAMPs unterdrückbar, von Proteinkinase A abhängig zu sein. Eine Hemmung durch Thapsigargin reduzierte, allerdings nur unter Kaliumchlorid-reichen Konditionen, d. h. bei depolarisierter Zelle, den GLP-1-induzierten Calciumanstieg. Insgesamt kamen die Autoren zu dem Schluss, dass GLP-1 über die Proteinkinase A die Ryanodinrezeptoren gegenüber zytosolischem Calcium sensibilisieren [Holz et al., 1999; Islam et al., 1998]. Bei fehlender Kaliumzugabe war jedoch der GLP-1-Effekt durch Ryanodin nicht zu beeinflussen, so dass es schwierig erscheint, diese Ergebnisse eindeutig dem Ryanodinrezeptor zuzuschreiben. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe um Gromada die Ergebnisse, die sie bezüglich einer Beteiligung des Ryanodinrezeptors bei βTC3 -Zellen gefunden hatten (siehe oben, [Gromada et al., 1995]), für Maus- β -Zellen nicht bestätigen, da weder Thapsigargin noch Ryanodin einen Einfluss auf den GLP-1-Effekt hatten. Die Autoren gingen davon aus, dass bei Maus- β -Zellen intrazelluläre Calciumspeicher nicht beteiligt sind [Gromada et al., 1997].

4.4.6 Der cAMP-regulierten Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor Epac

Andere Untersuchungen sprechen wiederum für eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern durch GLP-1, die unabhängig von Proteinkinase A sind. So wurden 2 Isoformen eines cAMP-regulierten Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor cAMP-GEF bzw. Epac in INS-1-Zellen nachgewiesen. cAMP-abhängig über Epac2 wurde der Calcium-abhängige Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum durch GLP-1 getriggert. Die Calciumerhöhung erfolgte über einen Ryanodin-abhängigen Rezeptor und war unabhängig von Proteinkinase A, da $1\mu\text{M}$ H-89 zu keiner Inhibition führte. Interessanterweise und kontrovers zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte die Calciumerhöhung an INS-1-Zellen durch $200\mu\text{M}$ Rp-8Br-cAMPs blockiert werden [Kang et al., 2001]. Andererseits zeigte die gleiche Arbeitsgruppe um Kang ein Jahr später, dass sich bei INS-1-Zellen die Wirkung des Epac-spezifischen Agonisten 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP auf die Ryanodin-sensible, Calcium-induzierte Calciumerhöhung durch keins der getesteten Proteinkinase A-Hemmstoffe reduzieren ließ. Verwendet

wurden dabei KT5720, H-89 sowie eben auch Rp-8Br-cAMPs bis 300 μ M [Kang et al., 2003]. Eine Stellungnahme zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen bzgl. Rp-8Br- und Rp-cAMPs wird von den Autoren nicht gegeben und auch zwei Studien über die Eigenschaften verschiedener cAMP-Analoga bezüglich Epac und der Proteinkinase A bestätigen diese Diskrepanz. So konnte Rehmann et al., nachweisen, dass Rp-cAMPs Epac1 konzentrationsabhängig hemmt [Rehmann et al., 2003], während Christensen et al. bei den Rp-Abkömmlingen von cAMP keine Inhibition von Epac1, sondern nur von Proteinkinase A fanden [Christensen et al., 2003].

Es könnten mehr als 2 Epac-Isoformen involviert sein, wobei sich einige infolge einer unspezifischeren cAMP-Bindungsstelle durch Rp-cAMPs hemmen lassen, die durch 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP aktivierte aber unbeeinflusst bleibt. Die direkte Wirkung von Rp-cAMPs auf 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP wurde zumindest in der Ligandenanalyse von Rehmann nicht speziell untersucht.

Eine Beteiligung von Epac und nicht Proteinkinase A an der GLP-1- und cAMP-induzierten, Glukose-abhängigen Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration zum Beispiel über Öffnung der intrazellulären Calciumspeicher ließe sich mit den Resultate der hier aufgeführten Versuche zum Teil vereinbaren. Zu bedenken ist einerseits die oben beschriebene grundlegende Kontroverse, ob die intrazellulären Calciumspeicher bei der Signaltransduktion überhaupt eine bedeutende Rolle spielen. Weiterhin hat die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum keinen Einfluss auf die deutliche GLP-1-induzierte Depolarisation, so dass ein alleiniger Calciumanstieg durch intrazelluläre Speicher wenig wahrscheinlich ist.

Epac könnte aber auch in andere Bereiche der Signaltransduktion von GLP-1 eingebunden sein, die unabhängig von intrazellulären Calciumspeichern zum Beispiel die Aktivierung von Ionenkanälen in der Plasmamembran betrifft. An β -Zellen von Hamstern konnte ein GLP-1 und Glukose-abhängiger Natriumeinstrom nachgewiesen werden, der durch cAMP, Proteinkinase A-unabhängig reguliert wurde. Der GLP-1-induzierte Natriumstrom ließ sich durch 100 μ M Gadolinium, einem Hemmstoff für nicht-selektive Kationenkanäle, 2 μ M TTX, einen Inhibitor der spannungsabhängigen Natriumkanäle nicht beeinflussen. 1mM SQ-22536, ein Hemmstoff der Adenylatzyklase, führte ebenso wie 10 μ M H-89 nur unvollständig gehemmt werden

konnte. 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, ein Proteinkinase A-unabhängiger, Epac-spezifischer cAMP-Agonist erhöhte konzentrationsabhängig den Natriumeinstrom unabhängig von 10 μ M H-89. Die Autoren schlossen so auf einen Proteinkinase A-abhängigen und einen davon unabhängigen Anteil der GLP-1-Signaltransduktion, der durch Epac vermittelt wird [Miura et al., 2003].

4.5 Allgemeine Schlussfolgerungen für die GLP-1-induzierte Insulinsekretion

Insgesamt konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass die GLP-1 bzw. cAMP-induzierten Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration und der Membrandepolarisation unabhängig von Proteinkinase A und Tyrosinkinasen ist. Wahrscheinlicher ist, dass der Calcium-abhängige Anteil der GLP-1-Signaltransduktion vollständig unabhängig von der Phosphorylierung durch Proteinkinasen ist.

Ein Einfluss von Epac, cAMP selbst oder dem G-Protein direkt auf die Aktivität des ATP-abhängigen Kaliumkanals (K_{ATP} -Kanal) erscheint nach der unter Kapitel 4.4.1 aufgeführten Diskussion als fraglich. Eine wesentliche Bedeutung von spannungsabhängigen Calciumkanälen ist angesichts der unter Kapitel 4.4.4 diskutierten Ergebnisse nicht wahrscheinlich. Die Einbindung von intrazellulärem Calcium aus Ryanodin-sensiblen Kanälen als Calcium-induzierter Calciumaustrom oder zum Beispiel durch Epac (Kapitel 4.4.5 und 4.4.6) wird insgesamt sehr kontrovers diskutiert und kann zumindest für die Membrandepolarisation nicht verantwortlich sein.

An der möglichen Signaltransduktion von GLP-1, die die Membrandepolarisation und die Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration bewirken, könnten somit ein nicht selektiver Kationenkanal über cAMP alleinig (NSCC) oder in Kombination mit einer Hyperpolarisation (HCN) ebenso wie der cAMP-regulierte Ras Guanin-Nucleotid-Austausch-Faktor, Epac, beteiligt sein.

Um die Beteiligung von Proteinkinasen auf anderen, mitunter Calcium-unabhängigen Ebenen der Signaltransduktion von GLP-1 bis hin zur Insulinsekretion genau definieren zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen, vor allem mit spezifischeren und nebenwirkungsärmeren Inhibitoren und Messmethoden der verschiedenen beteiligten Ebenen notwendig.

Die bisher aufgeführten Schlussfolgerungen bezog sich auf den Calcium-abhängigen Anteil der GLP-1-potenzierten Insulinsekretion. Zawalich et al. konnten nachweisen, dass bereits durch 20nM Staurosporin, also deutlich unter den hier verwendeten Konzentrationen, die GLP-1-bedingte Erhöhung der Insulinsekretion bei perfundierten Langerhansschen Inseln der Ratte vollständig unterdrückt wurde [Zawalich et al., 1993].

Erklärbar wird dies, da neben der Calcium-abhängigen auch eine Calcium-unabhängige Exozytose von Insulin beschrieben ist. cAMP erhöhte an isolierten β -Zellen der Maus den Calciumeinstrom und die intrazelluläre Calciumkonzentration nur in geringem Maße, die Exozytose von Insulin dagegen deutlich, so dass bis zu 80% einer direkten Interaktion von cAMP unabhängig von Calcium zugeschrieben wurde. Beide Wege (Ca^{2+} -abhängig und unabhängig) waren allerdings abhängig von Proteinkinase A und ließen sich mit 20 μM Rp-cAMPs hemmen [Ämmälä et al., 1993]. Bei Zawalich et al. blieb jedoch trotz Staurosporin die erste Phase der Insulinsekretion erhalten, was zu den hier dargestellten Ergebnissen passt [Zawalich et al., 1993].

Die Insulinsekretion ist biphasisch aus zwei unterschiedlichen Gruppen von Granula zusammengesetzt zu sein. Initial wird der kleine (unter 0,5%) Pool, der bereit für die Freisetzung ist, durch einen Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels ATP-unabhängig exozytiert. Calcium ist dabei der Initiator. Durch GLP-1 bzw. cAMP wird, nach den hier aufgeführten Resultaten, den intrazellulären Calciumspiegel unabhängig von Proteinkinase A und Tyrosinkinasen erhöht. So können diese Kinasen bei diesem Calcium-abhängigen Pfad der cAMP-induzierten Insulinsekretion keine entscheidende Rolle spielen. Es konnte entsprechend gezeigt werden, dass der Proteinkinase-A-unabhängige Anteil der cAMP-induzierten Insulinsekretion der schnellen Phase (unter 80ms) entsprach und somit den schon mobilisierten Pool betraf [Renström et al., 1997].

Daneben wird der Reservepool durch cAMP beeinflusst, so dass mehr Insulingranula ATP-abhängig in den unmittelbar bereitstehenden Pool mobilisiert werden. Die Vesikel werden aber nicht für Calcium sensibilisiert, da die benötigte Calciumkonzentration in Relation gleich bleibt. Vielmehr erhöht sich die Menge oder Größe der mobilisierten Granula, so dass der zur Exozytose bereitstehende Granula-Pool vergrößert wird [Renström et al., 1997]. Dies könnte somit auch ohne direkte Einwirkung von Calcium wohl aber über Proteinkinasen geschehen. Somit kann dieser Pfad die deutliche

Reduktion der GLP-1-bedingten Erhöhung der Insulinsekretion durch 20nM Staurosporin erklären [Zawalich et al., 1993].

Proteinkinasen könnten distal der Calciumerhöhung und Membrandepolarisation auf die GLP-1-bedingte Verstärkung des Insulinsekretion Einfluss nehmen. So wurde zum Beispiel beschrieben, dass SNAP25, ein für Verschmelzung von Insulingranula und Plasmamembran erforderliches SNARE-Protein, durch Glukose und zusätzlich GLP-1 an Tyrosin phosphoryliert wird. Dieser Effekt ließ sich mit höheren Genisteinkonzentrationen (300 μ M) hemmen und bewirkte eine Reduktion der Insulinsekretion [Zhou et al., 1997].

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass der Calcium-abhängig Anteil der Signaltransduktion von GLP-1- bzw. cAMP, der über eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration und Membrandepolarisation die Insulinsekretion verstärkt, unabhängig von Proteinkinase A und Tyrosinkinasen ist. Um den genauen Mechanismus, unter anderem welche Ionenkanäle beeinflusst werden, aufzuschlüsseln, sind weitere Untersuchungen zum Beispiel des NSCC, HCN oder von Epac notwendig.

5. Zusammenfassung

Glucagon-like Peptide-1(7-37)/(7-36)amid, GLP-1, ist ein insulinotropes intestinales Peptid-Hormon, das vor allem wegen der Verstärkung der Glukose-abhängigen Insulinsekretion, ein großes Potential bei der Therapie des Diabetes mellitus hat. Die Signaltransduktion von GLP-1 ist in weiten Teilen noch nicht geklärt. Bisherige Studien ergaben, dass GLP-1 an den G-Protein-gekoppelten GLP-1-Rezeptor bindet. Über Aktivierung der Adenylatzyklase erhöht sich der cAMP-Spiegel. Letztlich kommt es durch unbekannte Schritte zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und zu einer erhöhten Insulinsekretion. Oftmals sind bei der Signaltransduktion Proteinkinasen wie die cAMP-abhängige Proteinkinase A oder Tyrosinkinasen beteiligt, so dass dies auch bei der GLP-1-induzierten Calciumerhöhung und Insulinsekretion vermutet wurde. Bisherige Arbeiten wurden oft ungeeignete β -Zellmodelle ausgeführt, verwendet zum Beispiel nur ein Proteinkinase A-Hemmstoff und kamen so zu unterschiedlichen Ergebnissen über die Bedeutung von Proteinkinasen bei der Signaltransduktion von GLP-1.

Ziel dieser Arbeit war es, die Beteiligung von Proteinkinase A und Tyrosinkinasen an der Calcium-abhängigen Signaltransduktion von Glucagon-like Peptide 1(7-36)amid in Insulin-sezernierenden Zellen des endokrinen Pankreas zu untersuchen. Dazu wurde 1.) eines geeigneten β -Zellmodell, hier die Glukose-sensible INS-1-Zellen sowie β -Zellen in präparierten Langerhanssche Inseln der Maus, und 2.) verschiedene, angemessene Proteinkinasehemmstoffe verwendet. Mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fura-2 bzw. Bisoxonol wurden die intrazelluläre Calciumkonzentrationen an beiden Zelltypen sowie Veränderungen im Membranpotential der INS-1-Zellen gemessen. Um Artefakte am Rezeptor auszuschließen, wurde neben GLP-1 durch Forskolin die Adenylatzyklase direkt aktiviert.

Weder durch den selektiven Proteinkinase A-Hemmstoff KT5720 (bis zu $20\mu\text{M}$) noch Rp-cAMPs (bis 1mM) konnte eine Hemmung der GLP-1- oder Forskolin-Wirkung erzielt werden. Der dritte Proteinkinase A-Inhibitor H-89 selbst führte konzentrationsabhängig (bis $40\mu\text{M}$) zu einer deutlichen Reduktion der Glukose-induzierten Effekte, wie den Calciumanstieg oder den Calciumoszillationen der

Langerhansschen Inseln. Erst durch lange Inkubationszeiten mit deutlich höheren als sonst verwendeten Konzentrationen ließen sich die GLP-1 bzw. Forskolin-induzierte Erhöhung des Calciumspiegels sowie die Membrandepolarisation leicht reduzieren, so dass es sich dabei eher um einen sekundären Effekt infolge des verminderten Glukoseeinflusses zu handeln scheint. Insgesamt zeigte die fehlende Inhibition durch die drei Hemmstoffe, dass die Proteinkinase A an der Signaltransduktion von GLP-1 bzw. Forskolin zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels nicht beteiligt ist.

Die Tyrosinkinase-Hemmstoffe Genistein (bis 100 μ M) und Herbimycin A (bis 20 μ M) führten beide, Genistein mehr als Herbimycin A, zu konzentrationsabhängigen, massiven Veränderungen der Glukose-abhängigen Calciumerhöhung sowie der Calciumoszillationen. Die Ursache hierfür, ob es sich dabei zum Beispiel um eine spezifische Tyrosinkinase-Hemmung oder vielleicht einen unspezifischen toxischen Effekt handelt, werden in der Literatur kontrovers diskutiert. In Relation zu diesen starken Veränderungen der Glukosewirkung ließ sich bei keinem der beiden Hemmstoffe eine isolierte Inhibition des GLP-1 oder Forskolin-Effektes zeigen.

Auch der potente, unspezifische Proteinkinasehemmstoff Staurosporin bei relevanter Dosierung zeigte keine Beeinflussung der durch GLP-1 und Forskolin bedingten Calciumerhöhung sowie der Membrandepolarisation.

Insgesamt zeigt dies Arbeit, dass für den GLP-1-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und der Membrandepolarisation weder Proteinkinase A noch Tyrosinkinasen, eher sogar keine Proteinkinase eine entscheidende Rolle spielt. An der möglichen Signaltransduktion dieser GLP-1-Effekte könnten ein nicht selektiver Kationenkanal über cAMP alleinig (NSCC) oder in Kombination mit einer Hyperpolarisation (HCN) ebenso wie der cAMP-regulierte Ras Guanin-Nucleotid-Austausch-Faktor, Epac, beteiligt sein. Um den genauen Mechanismus, unter anderem welche Ionenkanäle beeinflusst werden, aufzuschlüsseln, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Zudem ist zu erwähnen, dass in der Literatur ebenfalls ein Calcium-unabhängiger Anteil der GLP-1-induzierten Insulinsekretion beschrieben ist. So ist eine Beteiligung von Proteinkinasen distal der Calciumerhöhung, zum Beispiel durch Vergrößerung des Reservepools der Insulingranula oder einer Tyrosinkinase-abhängig verstärkter Exozytose, durchaus mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbar.

6. Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosin-5' triphosphat
BAPTA	1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Bisoxonol	Bis-(1,3-diethylthiobarbiturat)-trimethinoxonol
CaM-Kinase	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CICR	Calcium-induzierte Calciumfreisetzung
CREB	cAMP-response-element bindendes Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP IV	Dipeptidyl-peptidase IV
DTPA	Diphenyltetraminepentaacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
Epac	cAMP-regulated Ras guanine nucleotide exchange factor
FCS	Fötale Kälberserum
GDP / GTP	Guanosindiphosphat / Guanosintriphosphat
GIP	gastrisch inhibierende Polypeptid
GLP-1	Glucagon-like Peptide 1, soweit nicht anderes aufgeführt GLP-1(7-36)amid
H-89	N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinoline sulfonamid)
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
INS-1	Insulin sezernierende Insulinomzelllinie
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K5720	(8R*,9S*,11S*)-(-)-9-hydroxy-9-n-hexyleser-8-methyl-2,3,9,10,- tetrahydro-8,11-epoxy-1H,8H,11H-2,7b,11a-triazadibenzo[a,g] cycloocta[c,d,e]trin-den-1-one)
K ⁺ _{ATP} -Kanal	ATP-abhängiger Kaliumkanal
K _d	Dissoziationskonstante
K _I	Konzentration der halbmaximalen Inhibition
K _S	Konzentration der halbmaximalen Stimulation
MAPK	Mitogen-aktivierten Kinasen
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NSCC	nicht selektiver Kationenkanal
PKA	Proteinkinase A
Rp-cAMPs	Rp Diastereomer von zyklischem Adenosin-3',5'-Monophosphorothioat
SERCA	Ca ²⁺ -Adenosintriphosphatase des Sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
Sp-cAMPs	Sp Diastereomer von zyklischem Adenosin-3',5'-Monophosphorothioat
Tris	tris-hydroxymethyl-aminomethane
VDCC	(voltage-dependent) spannungsabhängiger Calciumkanal

7. Literaturverzeichnis

Accili E.A., Proenza C., DiFrancesco D.: From funny current to HCN channels: 20 years of excitation.

News Physiol Sci 17: 32-37, 2002

Acitores A., Gonzalez N., Sancho V., Valverde I., Villanueva-Penacarrillo M.L.: Cell signalling of glucagon-like peptide-1 action in rat skeletal muscle.

J Endocrinol 180: 389-398, 2004

Ämmälä C., Ashcroft F.M., Rorsman P.: Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single β -cells.

Nature 363: 356-358, 1993

Aguilar-Bryan L., Nichols C.G., Wechsler S.W., Clement IV J.P., Boyd III A.E., Gonzalez G., Herrera-Sosa H., Nguy K., Bryan J., Nelson D.A.: Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: regulator of insulin secretion.

Science 268: 423-426, 1995

Ahrén B., Larsson H., Holst J.J.: Effects of glucagon-like peptid 1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus.

J Clin Endocrinol Metab 82: 473-478, 1997

Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y.: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases.

J Biol Chem 262: 5592-5595, 1987

Alberti K.G., Zimmet P.Z.: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complication. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation.

Diabet Med 15: 539-553, 1998

Antunes C.M., Salgado A.P., Rosario L.M., Santo R.M.: Differential patterns of glucose-induced electrical activity and intracellular calcium responses in single mouse and rat pancreatic islets.

Diabetes 49: 2028-2038, 2000

Asfari M., Janjic D., Meda P., Li G., Halban P.A., Wollheim C.B.: Establishment of 2-Mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines.

Endocrinology 130: 167-178, 1992

Ashcroft F.M., Rorsman P.: Electrophysiology of the pancreatic beta-cell.

Prog Biophys Mol Biol 54: 87-143, 1989

Ashcroft F.M.: Protein phosphorylation and beta-cell function.

Diabetologia 37: S21-S29, 1994

Ashcroft S.J.H., Stubbs M.: The glucose sensor in HIT T15 cells is the glucose transporter.

FEBS Letter 219: 311-315, 1987

Asokanathan N., Cake M.H.: Stimulation of surfactant lipid secretion from fetal type II pneumocytes by gastrin-releasing peptide.

Am J Physiol 270: L331-L337, 1996

Balkan B., Kwasnik L., Miserendino R., Holst J.J., Li X.: Inhibition of dipeptidyl peptidase IV with NVP-DPP728 increases plasma GLP 1(7-36 amide) concentrations and improves oral glucose tolerance in obese Zucker rats.

Diabetologia 42: 1324-1331, 1999

Barragán J.M., Rodríguez R.E., Blázquez E.: Changes in arterial blood pressure and heart rate induced by glucagon-like peptide 1 (7-36) amide in rats.

Am J Physiol 266: E459-466, 1994

Bataille D., Coudray A.M., Carlqvist M., Rosselin G., Mett V.: Isolation of glucagon-37 (bioactive enteroglucagon / oxyntomodulin) from porcine jejunum-ileum.

FEBS Letters 146: 73-78, 1982

Béguin P., Nagashima K., Nishimura M., Gono T., Seino S.: PKA-mediated phosphorylation of the human K_{ATP} channel: separate roles of Kir6.2 and SUR1 subunit phosphorylation. EMBO Journal 18: 4722-4732, 1999

Bell G.I., Santerre R.F., Mullenbach G.T.: Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. Nature 302: 716, 1983

Bergsten P.: Role of oscillations in membrane potential, cytoplasmic Ca^{2+} , and metabolism for plasma insulin oscillations.

Diabetes 51: S171-S176, 2002

Berridge M.J.: Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers.

Ann Rev Biochem 56: 159-193, 1987

Berridge M.J.: inositol trisphosphate and calcium signalling.

Nature 361: 315-325, 1993

Bode H.P., Göke B.: Protein kinase C activates capacitative calcium entry in the insulin secreting cell line RINm5F.

FEBS Letters 339: 307-311, 1994

Britsch S., Krippeit-Drews P., Lang F., Gregor M., Drews G.: Glucagon-like peptide-1 modulates Ca^{2+} current but not K_{ATP}^{+} current in intact mouse pancreatic B-cells.

Biochem Biophys Res Commun 207: 33-39, 1995

Buchan A.M., Polak J.M., Capella C., Solcia E., Pearse A.G.E.: Electron immunocytochemical evidence for the K cell localization of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in man.
Histochemistry 56: 37-44, 1978

Buteau J., Foisy A., Rhodes C.J., Carpenter L., Biden T.J., Prentki J.: Protein kinase C ζ activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic β -cell proliferation
Diabetes 50: 2237-2243, 2001

Buteau J., Foisy A., Joly E., Prentki J.: Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic β -cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor.
Diabetes 52: 124-132, 2003

Carafoli E.: Intracellular calcium homeostasis.
Ann Rev Biochem 56: 395-433, 1987

Chick W.L., Warren S., Chute R.N., Like A.A., Lauris V.: A transplantable insulinoma in the rat.
Proc Natl Acad Sci USA 74: 628-632, 1977

Chijiwa T., Mishima A., Hagiwara M., Sano M., Hayashi K., Inoue T., Naito K., Toshioka T., Hidaka H.: Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H 89), of PC12D pheochromocytoma cells.
J Biol Chem 265: 5267-5272, 1990

Christensen A.E., Selheim F., de Rooij J., Dremier S., Schwede F., Dao K.K., Martinez A., Maenhaut C., Bos J.L., Genieser H.,-G., Doskeland S.O.: cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase.
J Biol Chem 278: 35394-35402, 2003

Classen M., Diehl V., Kochsiek K.: Innere Medizin.
Urban und Schwarzenberg München, 2., überarbeitete Auflage, 1993

Cobbold P.H., Rink T.J.: Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium.
Biochem J 248: 313-328, 1987

Creutzfeldt W.: The incretin concept today.
Diabetologia 16: 75-85, 1979

Creutzfeldt W.O.C., Kleine N., Willms B., Orskov C., Holst J.J., Nauck M.A.: Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptid 1 (1-36) amide in Type 1 diabetes patients.
Diabetes care 19: 580-586, 1996

Della Rocca G.J., Maudsley S., Daaka Y., Lefkowitz R.J., Luttrell L.M.: Pleotropic coupling of G Protein-coupled receptors to the mitogen-activated protein kinase cascade. Role of focal adhesions and receptor tyrosine kinases.
J Bio Chem 274: 13978-13984, 1999

DeFronzo R.A.: Pharmacologic therapy for Type 2 Diabetes mellitus. Review.
Ann Intern Med: 131: 281-303, 1999

De Weille J.R., Schmid-Antomarchi H., Fosset M., Lazdunski M.: Regulation of ATP-sensitive K⁺ channels in insulinoma cells: Activation by somatostatin and protein kinase C and the role of cAMP.
Proc Natl Acad Sci USA 86: 2971-2975, 1989

Dillon J.S., Tanizawa Y., Wheeler M.B., Leng X-H., Ligon B.B., Rabin D.U., Yoo-Waren H., Permutt M.A., Boyd III A.E.: Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor.
Endocrinology 133: 1907-1910, 1993

Dixon R.A., Ferreira D.: Molecules of interest: Genistein.
Phytochemistry 60: 205-211, 2002

Dorstmann W.R.G., Taylor S.S., Genieser H.G., Jastorff B., Doskeland S.O., Ogreid D.: Probing the cyclic nucleotide binding sites of cAMP-dependent protein kinase I and II with analogs of adenosine 3',5'-cyclic phosphorothionates.
J Biol Chem 265: 10484-10491, 1990

Drucker D.J., Phillippe J., Mojsov S., Chick W.L., Habener J.F.: Glucagon-like peptide-1 stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line.
Proc Natl Acad Sci USA 84: 3434-3438, 1987

Drucker D.J., Asa S.: Glucagon gene expression in vertebrate brain.
J Biological Chemistry 263: 13475-13478, 1988

Dukes I.D., Philipson L.H.: K⁺ Channels: generating excitement in pancreatic β -cells.
Diabetes 45: 845-853, 1996

Ebert R., Creutzfeld W.: Influenz of gastric inhibitory polypeptid antiserum on glucose-induced insulin secretion in rats.
Endocrinology 111: 1601-1606, 1982

Eliasson L., Ma X., Renström E., Barg S., Berggren P.-O., Galvanovskis J., Gromada J., Jing X., Lundquist I., Salehi A., Sewing S., Rorsmann P.: SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells.
J Gen Physiol 121: 181-197, 2003

Elliott R.M., Morgan L.M., Tregder J.A., Deacon S., Wright J., Marks V.: Glucagon-like peptide 1 (7-36) amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion in patterns.

J Endocrinol 138: 159-166, 1993

Eissele R., Göke R., Willemer S., Harthus H.P., Vermeer H., Arnold R., Göke B.: Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man.

Eur J Clin Invest 22: 283-291, 1992

Fehmann H.C., Göke B., Göke R., Trautmann M.E., Arnold R.: Synergistic stimulatory effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide on endocrine rat pancreas.

FEBS Lett 252: 109-112, 1989

Fehmann H.C., Habener J.F.: Homologous desensitization of the insulinotropic glucagon-like peptide-1 (7-37) receptor on insulinoma (HIT-T15) cells.

Endocrinology 128: 2880-2888, 1991a

Fehmann H.C., Habener J.F.: Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37) on a somatostatin secreting cell line.

FEBS Lett 279, 335-340, 1991b

Fehmann H.C., Habener J.F.: Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma β TC-1 cells.

Endo 130: 159-166, 1992

Fehmann H.C., Göke R., Göke B.: Cell and molecular biology of the incretion hormone glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin releasing polypeptide.

Endocr Rev 16: 390-410, 1995a

Fehmann H.C., Hering B.-J., Wolf M.-J., Brandhorst H., Brandhorst D., Bretzel R.G., Federlin K., Göke B.: The effects of glucagon-like peptide 1 (GLP1) on hormone secretion from isolated human pancreatic islets.

Pancreas 11: 196-200, 1995b

Finn J.T., Grunwald M.E., Yau K.W.: Cyclic nucleotide-gated ion channels: An extended family with diverse functions.

Annu Rev Physiol 58: 395-426, 1996

Fraser I.D.C., Tavalin S.J., Lester L.B., Langeberg L.K., Westphal A.M., Dean R.A., Marrion N.V., Scott J.D.: A novel lipid-anchored A-kinase anchoring protein facilitates cAMP-responsive membrane events.

The EMBO Journal 17: 2261-2272, 1998

Fukazawa H., Li P.M., Yamamoto C., Murakami Y., Mizuno S., Uehara Y.: Specific inhibition of cytoplasmic protein tyrosin kinases by herbimycin A in vitro. *Biochem Pharmacol* 42: 1661-1671, 1991

Gefel D., Hendrick G.K., Mojsov S., Habener F.J., Weir G.C.: Glucagon-like peptide 1 analogs: effects on insulin secretion and adenosine 3', 5'-monophosphate formation. *Endocrinology* 126: 2164-2168, 1990

Gilon P., Henquin J.C.: Influence of membrane potential changes of cytoplasmic Ca^{2+} concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J Biol Chem* 267: 20713-20720, 1992

Gilon P., Shepherd R.M., Henquin J.C.: Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} as evidenced in single pancreatic islets. *J Biol Chem* 268: 22265-22268, 1993

Gilon P., Jonas J.C., Henquin J.C.: Culture duration and conditions affect the oscillations of cytoplasmic calcium concentration induced by glucose in mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 37: 1007-1014, 1994

Göke B., Steffen H., Göke R.: The signal transduction of the glucagon-like peptide 1 receptor: fishing beyond the protein kinase level. *Acta Physiol Scand* 157: 321-328, 1996

Göke R., Conlon J.M.: Receptors for glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on rat insulinoma-derived cells. *J Endocrinol* 116: 357-362, 1988

Göke R., Trautmann M.E., Haus E., Richter G., Fehmann H.C., Arnold R., Göke B.: Signal transmission after GLP-1(7-37)amide binding in RINm5F cells. *Am J Physiol* 257: G397-G401, 1989

Göke R., Fehmann H.C., Göke B.: Glucagon-like peptide 1 (7-36) amide is a new incretin/enterogastrone candidate. *Eur J Clin Invest* 21: 135-144, 1991

Göke R., Wagner B., Fehmann H.C., Göke B.: Glucose-dependency of the insulin stimulatory effect of glucagon-like peptide 1 (7-36) amide on the rat pancreas. *Res Exp Med* 193:97-103, 1993

Graziano M.P., Hey P.J., Borkowski D., Chicchi G.G., Strader C.D.: Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 196: 141-146, 1993

Gromada J., Dissing S., Bokvist K., Renstrom E., Frokjaer-Jensen J., Wulff B.S., Rorsman P.: Glucagon-like peptide I increases cytoplasmic calcium in insulin-secreting β TC3-cells by enhancement of intracellular calcium mobilization. *Diabetes* 44: 767-774, 1995

Gromada J., Ding W.G., Barg S., Renström E., Rorsman R.: Multisite regulation of insulin secretion by cAMP-increasing agonists: evidence that glukagon-like peptide 1 and glukagon act via distinct receptors.
Pflügers Arch- Eur J Physiol 434: 515-521, 1997

Gromada J., Holst J.J., Rosman P.: Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glukagon-like peptid 1.
Pflügers Arch Eur J Physiol 435: 583-594, 1998a

Gromada J., Anker C., Bokvist K., Knudsen L.B., Wahl P.: Glucagon-like peptide-1 receptor expression in *Xenopus* oocytes stimulates inositol trisphosphate-dependent intracellular Ca²⁺ mobilization.
FEBS Letters 425: 277-280, 1998b

Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y.: A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties.
J Biol Chem 260:3440-3450, 1985

Hayashi H., Miyata H.: Fluorescence imaging of intracellular Ca²⁺.
JPM 31: 1-10, 1994

Gutniak M., Orskov C., Holst J.J., Ahrén B., Efendic S.: Antidiabetogenic effect of glukagon-like peptide-1 (7-36) amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus.
N Engl J Med 326: 1316-1322, 1992

Gutzwiller J-P., Göke B., Drewe J., Hildebrand P., Ketterer S., Handschin D., Winterhalder R., Conen D., Beglinger C.: Glucagon-like peptid 1: a potent regulator of food intake in humans.
Gut 44: 81-86, 1999

Haugland R.P.: Handbook of fluorescent probes and research chemicals.
Molecular Probes

Heller R.S., Aponte G.W.: Intra-islet regulation of hormone secretion by glukagon-like peptid 1 (7-36) amide.
Am J Physiol 269: G852-860, 1995

Heller R.S., Kieffer T.J., Habener J.F.: Insulinotropic glukagon-like peptid 1 receptor expression in glukagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas.
Diabetes 46: 785-791, 1997

Henquin J.C., Schmeer W., Meissner H.P.: Forskolin, an activator of adenylate cyclase, increases Ca²⁺-dependent electrical activity induced by glucose in mouse pancreatic B cells.
Endocrinology 112: 2218-2220, 1983

Henquin J.C., Meissner H.P.: The ionic, electrical, and secretory effects of endogenous cyclic adenosine monophosphate in mouse pancreatic B cells: studies with Forskolin. *Endocrinology* 15: 1125-1134, 1984

Henquin J.C.; Ishiyama N., Nequin M., Ravier M.A., Jonas J.C.: Signals and pools underlying biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51: S60-S67; 2002

Herrmann C., Göke R., Richter G., Fehmann H.C., Arnold R., Göke B.: glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56: 117-126, 1995

Hidaka H., Watanabe M., Kobayashi R.: Properties and use of H-series compounds as protein kinase inhibitors. *Methods Enzymol* 201: 328-339, 1991

Holst J.J., Orskov C., Nielsen V., Schwartz T.W.: Truncated glucagon-like peptide 1, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS Letters* 211: 169-174, 1987

Holst J.J., Deacon C.F.: Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for Type 2 diabetes. *Diabetes* 47: 1663-1670, 1998

Holz G.G., Kuhlreiber W.M., Habener J.F.: Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature* 361: 362-365, 1993

Holz G.G., Leech C.A., Habener J.F.: Activation of a cAMP-regulated Ca²⁺-signaling pathway in pancreatic beta-cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. *J Biol Chem* 270: 17749-17757, 1995

Holz G.G., Leech C.A.: Glucagon-Like Peptide-1 and the Glucose competence concept of pancreatic beta-cell function. *Aus: The insulinotropic gut hormone glucagon-like peptide-1. Editoren: Fehmann H.C., Göke B. Front Diabetes, Karger, Vol. 13: 171-193, 1997*

Holz G.G., Leech C.A., Heller R.S., Castonguay M., Habener J.F.: cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca²⁺ stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 274: 14147-14156, 1999

Holz G.G.: Epac: a new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic β -cell. *Diabetes* 53: 5-13, 2004

Hool L.C., Middleton L.M., Harvey R.D.: Genistein increases the sensitivity of cardiac ion channels to β -adrenergic receptor stimulation.
Circ Res 83: 33-42, 1998

Hunter T.: Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling.
Cell 80: 225-236, 1995

Hupe-Sodemann K., McGregor G.P., Bridenbaugh R., Göke R., Göke B., Thole H.H., Zimmermann B., Voigt K.: Characterisation of the processing by human neural endopeptidase 24.11 of GLP-1 (7-36)amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides.
Regul Pept. 58: 149-156, 1995

Iida Y., Senda T., Matsukawa Y., Onoda K., Miyazaki J.-I., Sakaguchi H., Nimura Y., Hidaka H., Niki I.: Myosin light-chain phosphorylation controls insulin secretion at a proximal step in the secretory cascade.
Am J Physiol 273, E782-789, 1997

Insel P.A., Ostrom R.S.: Forskolin als a tool for examining adenylat cyclase experssion, regulation and G protein signaling.
Cellular and molecular neurobiology 23: 305-314, 2003

Islam MD.S., Leibiger I., Leibiger B., Rossi D., Sorrentino V., Ekström T.J., Westerblad H., Andrade F.H., Berggren P.O.: In situ activation of the type 2 ryanodine receptor in pancreatic beta cells requires cAMP-dependent phosphorylation.
Proc Natl Acad Sci USA 95: 6145-6150, 1998

Jonas J.C., Plant T.D., Gilon P., Dectimary P., Nenquin M., Henquin J.C.: Multiple effects and stimulation of insulin secretion by the tyrosine kinase inhibitor genistein in normal mouse islets.
Br J Pharmacol 114: 872-880, 1995

Jonas J.C., Henquin J.C.: Possible involvment of tyrosine kinase-dependent pathway in the regulation of phosphoinositide metabolism by vanadate in normal mouse islets.
Biochem J 315: 49-55, 1996

Jones P.M., Persaud S.J.: Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic β -cells.
Endocrine reviews 19 (4): 429-461, 1998

Junqueira L. C., Carneiro J.: Histologie.
Springer-Verlag 3. Auflage, 1991

Kang G., Chepurny O.G., Holz G.G.: cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in INS-1 pancreatic β -cells.
J Physiol 536.2: 375-385, 2001

Kang G., Joseph J.W., Chepurny O.G., Monaco M., Wheeler M.B., Bos J.L., Schwede F., Genieser H.G., Holz G.G.: Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic β -cells.
J Biol Chem 278: 8279-8285, 2003

Kao J.P.Y.: Practical aspects of measuring [Ca²⁺] with fluorescence indicators.
Methodes in Cell biology 40: 155-181, 1994

Kase H., Iwahashi K., Nakanishi S., Matsuda Y., Yamada K., Takahashi M., Murakata C., Sato A., Kaneko M.: K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases.
Biochem Biophys Comm 142: 436-440, 1987

Kato M.: Growth hormone-releasing hormone augments voltage-gated Na⁺ current in cultured rat pituitary cells.
Am J Physiol 270: C125-130, 1996

Kennedy R.T., Kauri L.M., Dahlgren G.M., Jung S.K.: Metabolic oscillations in β -cells.
Diabetes 51: S152-S161, 2002

Kjems L.L., Ravier MA., Jonas J.C., Henquin J.C.: Do oscillations of insulin secretion occur in the absence of cytoplasmatic Ca²⁺ oscillations in β -cells?
Diabetes 51: S177-S182, 2002

Kolligs F., Fehmann H.C., Göke R., Göke B.: Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide 1 receptor antagonist exendin (9-39) amide.
Diabetes 44: 16-19, 1995

Komatsu R., Matsuyama T., Namba M., Watanabe N., Itoh H., Kono N., Tarui S.: Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide.
Diabetes 38: 902-905, 1989

Konrad R.J., Dean R.M., Young R.A., Billings P.C., Wolf B.A.: Glucose-induced tyrosine phosphorylation of p125 in beta cells and pancreatic islets.
J Biol Chem 271: 24179-24186, 1996

Kreutzig T.: Biochemie.
Jungjohann Verlagsgesellschaft. 7. Auflage, 1993

Kreymann B., Ghatel M.a., Williams G., Bloom S.R.: Glucagon-like peptide 1: a physiological incretin in man.
Lancet II: 1300-1304, 1987

Laurenza A., Khndelwal Y., De Souza N.J., Rupp R.H., Metzger H., Seamon K.B.: Stimulation of adenylate cyclase by water-soluble analogues of forskolin.
Mol Pharmacol 32: 133-139, 1987

Leech C.A., Habener J.F.: Insulinotropic glucagon-like peptide-1-mediated activation of non-selective Cation currents in insulinoma cells is mimicked by Maitotoxin.
J Biol Chem 272: 17987-17993, 1997

Leech C.A., Habener J.F.: A role for Ca²⁺-sensitive nonselective cation channels in regulating the membrane potential of pancreatic β -cells.
Diabetes 47: 1066-1073, 1998

Leemhuis J., Boutiller S., Schmidt G., Meyer D.K.: The Protein Kinase A inhibitor H89 acts on cell morphology by inhibiting Rho Kinase.
J Pharmacol Exp Ther 300: 1000-1007, 2002

Leibovitz H.E., Feinglos M.N.: Sulfonylurea drugs: mechanism of antidiabetic action and therapeutic usefulness.
Diabetes Care 1, 189-198, 1978

Light P.E., Manning Fox F.E., Riedel M.J., Wheeler M.B.: Glucagon-like peptide-1 inhibits pancreatic ATP-sensitive potassium channels via a protein kinase A and ADP-dependent mechanism.
Molecular Endocrinology 16: 2135-2144, 2002

Lu M., Wheeler M.B., Leng X-H., Boyd A.E.III.: The role of the free cytosolic Calcium level in β -cell signal transduction by Gastric inhibitory polypeptide and glucagon like peptide I(7-37).
Endocrinology 132: 94-100, 1993

Luque M.A., Gonzalez N., Marquez L., Acitores A., Redondo A., Morales M., Valverde I., Villanueva-Penacarrillo M.L.: Glucagon-like peptide-1 and glucose metabolism in human myocytes.
J Endocrinol 173: 465-473, 2002

MacDonald P.E., El-kholy W., Riedel M.J., Salapatek A.M.F., Light P.E., Wheeler M.B.: The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion.
Diabetes 51: S434-S442, 2002

Maechler P., Wollheim C.B.: Mitochondrial signals in glucose-stimulated insulin secretion in the beta cell.
J Physiol. 529.1: 49-56, 2000

Malarkey K., Belham C.M., Paul A., Graham A., McLees A., Scott P.H., Plevin R.: The regulation of tyrosine kinase signalling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors.
Biochem J 309: 361-375, 1995

Marquardt D.L., Walker L.L.: Inhibition of protein kinase A fails to alter mast cell adenosine responsiveness.
Agents Action 43: 7-12, 1994

McIntyre N., Holdsworth C.D., Turner D.S.: New interpretation of oral glucose tolerance.

Lancet II, 20-21, 1964

Meda P., Santos R.M., Atwater I.: Direct identification of electrophysiologically monitored cells within intact mouse islets of Langerhans.

Diabetes 35: 232-236, 1986

Meier J.J., Hücking K., Holst J., Deacon C.F., Schmiegel W.H., Nauck M.A.: Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes.

Diabetes 50: 2497-2504, 2001

Meier J.J., Nauck M.A., Schmidt W.E., Gallwitz B.: Gastric inhibitory polypeptide: the neglected incretin revisited.

Regular Peptides 107: 1-13, 2002

Meier J.J., Nauck M.A., Kranz D., Holst J.J., Deacon C.F., Gaeckler D., Schmidt W.E., Gallwitz B.: Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects.

Diabetes 53: 654-662, 2004

Mendez C.F., Leibiger I.B., Leibiger B., Hoy M., Gromada J., Berggren P.-O., Bertorello A.M.: Rapid association of protein kinase C- ϵ with insulin granules is essential for insulin exocytose. J Biol Chem 278: 44753-44757, 2003

Mentlein R., Gallwitz B., Schmidt W.E.: Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide 1 (7-36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum.

Eur J Biochem 214: 829-835, 1993

Miura Y, Matsui H.: Glucagon-like peptide-1 induces a cAMP-dependent increase of $[Na^+]_i$ associated with insulin secretion in pancreatic β cells.

Am J Physiol Endocrinol Metab 285: E1001-E1009, 2003

Moens K., Heimberg H., Flamez D., Huypens P., Quartier E., Ling Z., Pipeleers D., Gremlich S., Thorens B., Schuit F.: Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide-1, and glucose-dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells.

Diabetes 45: 257-261, 1996

Montrose-Rafizadeh C., Avdonin P., Garant M.J., Rodgers B.D., Kole S. Yang H., Levine M.A., Schwindinger W., Bernier M.: Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in chinese hamster ovary cells.

Endocrinology 140: 1132-1140, 1999

Moore B., Edie E.S., Abram J.H.: On the treatment of diabetes mellitus by acid extract of duodenal mucous membrane.
Biochem. J.1: 28-38, 1906

Mojsov S., Heinrich G., Wilson I.B., Ravazzola M., Orci L., Habener J.F.: Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translation processing.
J Bio Chem 261: 11880-11889, 1986

Mojsov S., Weir G.C., Habener J.F.: Insulinotropin: glucagon-like peptide-1 (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas.
J Clin Invest 79: 616-619, 1987

Nakazaki M., Crane A., Hu M., Seghers V., Ullrich S., Aguilar-Bryan L., Bryan J.: cAMP-activated protein kinase-independent potentiation of insulin secretion by cAMP is impaired in SUR1 null islets.
Diabetes 51: 3440-3449, 2002

Nauck M., Stöckmann F., Ebert R., Creutzfeldt W.: Reduced incretin effect in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes.
Diabetologia 29: 46-52, 1986

Nauck M.A., Heimesaat M.M., Orskov C., Holst J.J., Ebert R., Creutzfeldt W.: Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 (7-36) amide but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with Type-2 diabetes mellitus.
J Clin Invest 91: 301-307, 1993

Nauck M.A., Niedereichholz U., Ettler R., Holst J.J., Orskov C., Ritzel R., Schmiegel W.H.: Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans.
Am J Physiol 273: E981-988, 1997

Nauck M.A., Weber A., Bach I., Richter S., Orskov C., Holst J.J., Schmiegel W.: Normalization of fasting glycaemia by intravenous GLP-1 ([7-36 amide] or [7-37]) in Type 2 diabetic patients.
Diabet Med 15: 937-945, 1998

Newton A.C.: Protein Kinase C: Structure, function and regulation.
J Biol Chem 270: 28495-28498, 1995

Newton A.C.: Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm.
Biochem J 370: 361-371, 2003

Ogata Y., Nakao S., Shimizu E., Matsuda-Honjyo Y., Yamazaki M., Furuyama S., Sugiya H.: Tyrosine phosphorylation is involved in Ca²⁺ entry in human gingival fibroblasts.
Cell Biology international 27: 689-693, 2003

Olson L.K., Schoeder W., Robertson R.P., Goldberg N.D., Walseth T.F.: Suppression of adenylate kinase catalyzed phosphotransfer precedes and is associated with glucose-induced insulin secretion in intact HIT-T15 cells.

J Biol Chem 271: 16544-16552, 1996

Orskov C., Holst J.J., Poulsen S.S., Kirkegaard P.: Pankreatic and intestinal processing of proglucagon in man.

Diabetologia 30: 874-881, 1987

Orskov C., Wettergren A., Holst J.J.: Biological effects and metabolic rates of glucagon-like peptide-1 7-36 amide and glucagon-like peptide-1 (7-37) in healthy subjects are indistinguishable.

Diabetes 42: 658-661, 1993

Parker Botelho L.H., Rothermel J.D., Coombs R.V., Jastorff B.: cAMP analog antagonists of cAMP action.

Methods Enzymol 159: 159-172, 1988a

Perea A., Vinambres A., Clemente F., Villanueva-Penacarrillo M.L., Valverde I.: GLP-1 (7-36) amide: effects on glucose transport and metabolism in rat adipose tissue.

Horm Metab Res 29: 417-421, 1997

Perley M.J., Kipnis D.M.: Plasma insulin response to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects.

J Clin Invest 46: 1954-1962, 1967

Persaud S.J., Jones P.M., Wheeler-Jones C.P.D., Howell S.L.: Tyrosine kinases and the regulation of insulin secretion from adult rat islets. Abstrakt.

Diabetologia A433: A113, 1993

Persaud S.J., Harris T.E., Burns C.J., Jones P.M.: Tyrosine kinases play a permissive role in glucose-induced insulin secretion from adult rat islets. Journal of Molecular Endocrinology 22: 19-28, 1999

Philippe J., Missotten M.: Functional characterization of a cAMP-responsive element of the rat insulin I gene.

J Biol Chem 265: 1465-1469, 1990

Pietrobon D., di Virgilio F., Pozzan T.: Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells.

Eur J Biochem 193: 599-622, 1990

Prentki M., Matschinsky F.M.: Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion, Physiol Rev 67: 1185-1248, 1982

Rachmann J., Barrow B.A., Levy J.C., Turner R.C.: Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 in subjects with NIDDM.

Diabetologia 40: 205-211, 1997

- Ranganath L.R., Beety J.M., Morgan L.M., Wright J.W., Howland R., Marks V.: Attenuated GLP-1 secretion in obesity: cause or consequence?
Gut 38: 916-919, 1996
- Rask E., Secki J., Olsson T., Holst J.J., Söderberg S., Ahrens B., Johnson O.: Impaired incretin response after a mixed meal is associated with insulin resistance in nondiabetic men.
Diabetes Care 24: 1640-1645, 2001
- Ravier M.A., Gilon P., Henquin J.C.: Oscillations of insulin secretion can be triggered by imposed oscillations of cytoplasmatic Ca²⁺ or metabolism in normal mouse islets.
Diabetes 48: 2374-2382, 1999
- Ravier M.A., Henquin J.C.: Time and amplitude regulation of pulsatile insulin secretion by triggering and amplifying pathways in mouse islets.
FEBS Lett 530: 215-219, 2002
- Reale V., Hales C.N., Ashford M.L.: Nucleotide regulation of a calcium-activated cation channel in the rat insulinoma cell line, CRI-G1.
J Membrane Biology 141: 101-112, 1994
- Reale V., Hales C.N., Ashford M.L.: Regulation of calcium-activated nonselective cation channels activity by cyclic nucleotides in the rat insulinoma cell line, CRI-G1.
J Membrane Biology 145: 267-278, 1995
- Rehmann H., Schwede F., Doskeland S.O., Wittinghofer A., Bos J.L.: Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac.
J Biol Chem 278: 38548-38556, 2003
- Renström E., Eliasson L., Rorsman P.: Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells.
Physiol 502.1: 105-118, 1997
- Ribalet R., Ciani A.: Characterization of G protein coupling of a glucagon receptor to the K_{ATP} Channel in insulin-secreting cells.
J Membrane Biol 142: 395-408, 1994
- Richter G., Göke R., Göke B., Arnold R.: Characterization of receptors for glucagon-like peptid 1 (7-36) amide on rat lung membranes.
FEBS Lett 267: 78-80, 1990
- Richter G., Feddersen O., Wagner U., Barth P., Göke R., Göke B.: GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery. *Am J Physiol* 265: L374-381, 1993
- Rink T.J., Montecucco C., Hesketh T.R., Tsien R.Y.: Lymphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes.
Biochim Biophys Acta 595: 15-30; 1980

Roberge J.N., Brubaker P.L.: Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology* 133: 233-240, 1993

Roe M.W., Mertz R.J., Lancaster M.E., Worley III J.F., Dukes I.D.: Thapsigargin inhibits the glucose-induced decrease of intracellular Ca^{2+} in mouse islets of Langerhans. *Am J Physiol* 266: E852-E862, 1994

Rorsman P.: The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 40: 487-495, 1997

Rothermel J.D., Jastorff B., Parker Botelho L.H.: Inhibition of glucagon-induced glycogenolysis in isolated rat hepatocytes by the Rp Diastereomer of adenosine cyclic 3',5'-phosphorothioate. *J Biol Chem* 259: 8151-8155, 1984a

Rüegg U.T, Burgess G.M.: Staurosporin, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10: 218-220, 1989

Ruiz-Grande C., Pintado J., Alarcon C., Castilla C., Valverde I., Lopez-Novoa J.M.: Renal catabolism of human glucagon-like peptide 1 and 2. *Can J Physiol Pharmacol* 68: 1568-1573, 1990

Sandhu H., Wiesenthal S.R., MacDonald P.E., McCall R.H., Tchipashvili V., Rashid S., Satkunarajah M., Irwin D.M., Quing Shi Z., Brubaker P.L., Wheeler M.B., Vranic M., Efendic S., Giacca A.: Glucagon-like peptide-1 increases insulin sensitivity in depancreatized dogs. *Diabetes* 48:1 045-1053, 1999

Satoh T., Uehara Y., Kaziro Y.: Inhibition of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulated increase of active Ras-GTP by herbimycin A, a specific inhibitor of tyrosine kinases. *J Biol Chem* 267: 2537-2541, 1992

Schaap P., van Ments-Cohen M., Soede R.D.M., Brandt R., Firtel R.A., Dostmann W., Genieser H-G., Jastorff B., van Haastert P.J.M.: Cell-permeable non-hydrolyzable cAMP derivatives as tools for analysis of signaling pathways controlling gene regulation in *Dictyostelium*. *J Biol Cem* 268: 6323-6331, 1993

Schatzmann H.J.: The calcium pump of the surface membrane and of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Physiol* 51: 473-483, 1989

- Schjoldager B.T.G., Mortensen P.E., Christiansen., Oskov C., Holst J.J.: GLP-1 (glucagon-like peptide-1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans.
Dig Dis Sci 34: 703-708, 1989
- Schubert R., Serebryakov V.N., Mewes H., Hopp H.H.: Iloprost dilates rat small arteries: role of K_{ATP} - and K_{Ca} -channel activation by cAMP-dependent protein kinase.
Am J Physiol 272: H1147-1156, 1996
- Schuit F.C., Pipeleers D.G.: Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate levels in the pancreatic B cells.
Endocrinology 117: 834-840, 1985
- Secrist J.P., Sehgal I., Powis G., Abraham R.T.: Preferential inhibition of the platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase by staurosporine.
J Biol Chem. 265: 20394-20400, 1990
- Segre G.V., Goldring S.R.: Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagon-like peptide-1, growth hormone-releasing hormone and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family.
Trends Endocrinol Metab 4: 309-314, 1993
- Sekine N., Cirulli V., Regazzi R., Brown L.J., Gine E., Tamarit-Rodriguez J., Girotti M., Marie S., MacDonald M.J., Wollheim C.B.: Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta cells. Potential role in nutrient sensing. J Biol Chem 269: 4895-4902, 1994
- Sepp-Lorenzino L., Ma Z., Lebowitz D.E., Vinitzky A., Rosen N.: Herbermycin A induces the 20 S proteasome- and ubiquitin dependent degradation of receptor tyrosine kinase.
J Biol Chem 270: 16580-16587, 1995
- Shintani Y., Marunaka Y: Regulation of chloride channel trafficking by cyclic AMP via protein kinase A-independent pathway in A6 renal epithelial cells.
Biochem Biophys Res Commun 223: 234-239, 1996
- Silbernagl S., Despopoulos A.: Taschenatlas der Physiologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, 4., überarbeitete Auflage, 1991
- Skoglund G., Hussain M.A., Holz G.G.: Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene promoter activity by protein kinase A-independent activation of the rat insulin I gene cAMP response element.
Diabetes 49: 1156-1164, 2000
- Song S.H., Kjems L., Ritzel R., McIntyre S.M., Johnson M.L., Veldhuis J.D., Butler P.C.: Pulsatile insulin secretion by human pancreatic islets.
J Clin Endocrinol Metab 87: 213-221, 2002

Sorenson R.L., Brelje T.C., Roth C.: Effect of tyrosine kinase inhibitors on islets of Langerhans: Evidence for tyrosine kinase in the regulation of insulin secretion. *Endocrinology* 134: 1975-1978, 1994

Strader C.D., Fong M.T., Tota M.R., Underwood D.: Structure and function of G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 63: 1001-132, 1994

Stull J.T.: Ca²⁺-dependent cell signaling through cadmodulin-activated protein phosphatase and protein kinases. *J Biol Chem* 276: 2311-2312, 2001

Suga S., Kanno T., Nakano K., Takeo T., Dobashi Y., Wakui M.: GLP-1(7-36)amide augments Ba²⁺ current through L-type Ca²⁺-channel of rat pancreatic beta-cell in a cAMP-dependent manner. *Diabetes* 46: 1755-60, 1997

Suga S., Kanno T., Ogawa Y., Takeo T., Kamimura N., Wakui M.: cAMP-independent decrease of ATP-sensitive K⁺ channel activity by GLP-1 in rat pancreatic beta-cells. *Pflügers Arch* 440: 566-572, 2000

Suzuki S., Kawai K., Ohashi S., Mukai H., Yamashita K.: Comparison of the effects of various C-terminal and N-terminal fragment peptides of glucagon-like peptide 1 on insulin and glucagon release from the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology* 125: 3109-3113, 1989

Tang-Christensen M., Larsen P.J., Göke R., Fink-Jensen A., Jessop D.S., Moller M., Sheikh S.P.: Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol* 271: R848-856, 1996

Taylor S.S.: cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 264: 8443-8446, 1989

Thim L., Moody A.J.: The primary structure of porcine glicentin (proglucagon). *Regular Peptidess* 2: 139-150, 1981

Thorens B.: Expression cloning of the pancreatic β cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8641-8645, 1992

Thorens B., Widmann C.: Signaltransduction and desensitization of the glucagon-like peptide-1 receptor. *Acta Physiol Scand* 157: 317-319, 1996a

Thorens B., Deriaz N., Bosco D., DeVos A., Pipeleers D., Schuit F., Meda P., Porret A.: Protein kinase A-dependent phosphorylation of GLUT2 in pancreatic β cells. *J Biol Chem* 271: 8075-8081, 1996b

Thornton K., Gorenstein D.G.: Structure of glucagon-like peptide (7-36) amid in a dodecylphosphocholine micelle as determined by 2D NMR.
Biochemistry 33: 3532-3539, 1994

Tian Y., Laychock S.G.: Protein kinase C and calcium regulation of adenylyl cyclase in isolated rat pancreatic islets.
Diabetes 50: 2505-2513, 2001

Todd J.F., Edwards M.B., Ghatel M.A., Mather H.M., Bloom S.R.: Subcutaneous glucagon-like peptide-1 improves postprandial glycaemic control over a 3-week period in patients with early Type 2 diabetes.
Clin Sci 95: 325-329, 1998

Tsien R.Y.: New calcium indicators and buffers with a high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures.
Biochemistry 19: 2396-2404, 1980

Turton M.D., O'Shea D., Gunn I., Beak S.A., Edwards C.M.B., Meeran K., Choi S.J., Taylor G.M., Heath M.M., Lambert P.D., Wilding J.P.H., Smith D.M., Ghatel M.A., Herbert J., Bloom S.R.: A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding.
Nature London 379: 69-72, 1996

Unger R.H., Eisentraut A.M.: Entero-insular axis.
Arch. Intern. Med 123, 261-266, 1969

Uttenthal L.O., Blázquez E.: Characterization of high-affinity receptors for truncated glucagon-like peptide-1 in rat gastric glands.
FEBS Lett 262: 139-141, 1990

Vaag A.A., Holst J.J., Volund A., Beck-Nielsen H.B.: Gut incretin hormones in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) – evidence for decreased glucagon-like peptide 1 secretion during oral glucose ingestion in NIDDM twins. Eur J Endocrinol 135: 425-432. 1996

Valdeomillos M., Santos R.M., Contreras D., Soria B., Rosario L.M.: Glucose-induced oscillations of intracellular Ca^{2+} concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans.
FEBS Lett 259: 19-23, 1989

Valdeomillos M., Nadal A., Soria B., Gracia-Sancho J.: Fluorescence digital image analysis of glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans.
Diabetes 42:1210-14, 1993

Valverde I., Mérida E., Delgado E., Trapote M.A., Villanueva-Penacarrillo M.L.: Presence and characterization of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide receptors in solubilized membranes of rat adipose tissue.
Endocrinol 132: 75-79, 1993

Van Haastert P.J.M., Van Driel R., Jastorff B., Baraniak J., Stec W.J., De Witt R.J.W.: Competitive cAMP antagonists for cAMP-receptor proteins. *J Biol Chem* 259: 10020-10024, 1984

Velloso L.A., Carneiro E.M., Crepaldi S.C., Boschero A.C., Saad M.J.A.: Glucose- and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and its primary substrates IRS-1 and IRS-2 in rat pancreatic islets. *FEBS Letters* 377: 353-357, 1995

Vera J.C., Reyes A.M., Carcamo J.G., Velasquez F.V., Rivas C.I., Zhang R.H., Strobel P., Iribarren R., Scher H.I., Slebe J.C., Golde D.W.: Genistein is a natural inhibitor of hexose and dehydroascorbic acid transport through the glucose transporter, GLUT1. *J Biol Chem* 271: 8719-8724, 1996

Verspohl E.J., Tollkühn B., Kloss H.: Role of tyrosine kinase in insulin release in insulin secreting cell line (INS-1). *Cellular signaling* 7: 505-512, 1995

Villanueva-Penacarrillo M.L., Alcantara A.L., Clemente F., Delgado E., Valverde I.: Potent glycogenic effect of GLP-1(7-36) amide in rat skeletal muscle. *Diabetologia* 37: 1163-1166, 1994

Vilsboll T., Krarup T., Sonne J., Madsbad S., Volund A., Juul A.G., Holst J.J.: Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with typ 1 and 2 diabetes mellitus. *J Clinical Endocrinol Meta* 88: 2706-2713, 2003

Wang X., Zhou J., Doyle M.E., Egan J.M.: Glucagon-like peptide-1 causes pancreatic duodenal homeobox-1 protein translocation from the cytoplasm to the nucleus of pancreatic β -cells by a cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A-dependent mechanism. *Endocrinology* 142: 1820-1827, 2001

Wang Y., Perfetti R., Greig N.H., Holloway H.W., DeOre K.A., Montrose-Rafizadeh C., Elahi D., Egan J.M.: Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats. *J clin invest* 99: 2883-2889, 1997

Wei Y., Mojsov S.: Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-1: brain, haert and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS lett* 358: 219-224, 1995

Wenham R.M., Landt M., Easom R.A.: Glucose activates the multifunctional Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II in isolated rat pancreatic islets. *J Biol Chem* 269: 4947-4952, 1994

Wettergren A., Schjoldager B., Mortensen P-E., Myhre J., Christiansen J., Holst J.J.: Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic function in man.

Dig Dis Sci 38: 665-673, 1993

Wettergren A., Pridal L., Wojdemann M., Holst J.J.: Amidated and non-amidated glucagon-like peptide -1 (GLP-1): non-pancreatic effects (cephalic phase acid secretion) and stability in plasma in humans.

Regul Pept. 77: 83-87, 1998

Wheeler M.B., Lu M., Dillon J.S., Leng X.H., Chen C., Boyd III A.E.: Functional expression of the rat glucagon-like peptide-1 receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase C.

Endocrinology 133: 57-62, 1993

White J.W., Saunders G.F.: Structure of human glucagon gene.

Nucleic acids res 14: 4719-4730, 1986

Widmann C., Dolci W., Thorens B.: Agonist-induced internalization and recycling of the glucagon-like peptide-1 receptor in transfected fibroblasts and in insulinomas.

Biochem J 310: 203-214, 1995

Wollheim C.B., Sharp G.W.G.: Regulation of insulin release by calcium.

Physiol Rev 61: 914-973, 1981

Yada T., Itoh K., Nakata M.: Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide and a rise in cyclic adenosine 3',5'-monophosphate increase cytosolic free Ca^{2+} in rat pancreatic beta-cells by enhancing Ca^{2+} channel activity.

Endocrinology 133: 1685-1692, 1993

Yaekura K., Kakei M., Yada T.: cAMP-signaling pathway acts in selective synergism with glucose or tolbutamide to increase cytosolic Ca^{2+} in rat pancreatic beta-cells.

Diabetes 45: 295-301, 1996

Yajima H., Komatsu M., Schermerhorn T., Aizawa T., Kaneko T., Nagai M., Sharp G.W.G., Hashizume K.: cAMP enhances insulin secretion by action on the ATP-sensitive K^{+} channel-independent pathway of glucose signaling in rat pancreatic islets.

Diabetes 48: 1006-1012, 1999

Yanaihara C., Matsumoto T., Hong Y.M., Yanaihara N.: Isolation and chemical characterization of glicentin c-terminal hexapeptide in porcine pancreas.

FEBS Letters 189: 50-56, 1985

Yang C.M., Tsao H.L., Chiu C.T., Fan L.W., Yu S.M.: Regulation of 5-hydroxytryptamine-induced calcium mobilization by cAMP-elevating agents in cultured canine tracheal smooth muscle cells.

Pflügers Arch Eur J Physiol 432: 708-716, 1996

Yoshida T., Mio M., Tasaka K.: Cortisol secretion induces by substance P form bovine adrenocortical cells and its inhibition by calmodulin inhibitors.
Biochem Pharmacol 43: 513-517, 1992

Young S.W., Poole R.C., Hudson A.T., Halestrap A.P., Denton R.M., Tavaré J.M.:
Effects of tyrosine kinase inhibitors on protein kinase-independent systems.
FEBS Lett 316: 278-282, 1993

Zawalich W.S., Zawalich K.C., Rasmussen H.: Influence of glucagon-like peptide-1 on
beta cell responsiveness.
Regul Pept 44: 277-283, 1993

Zhou J., Egan J.M.: SNAP-25 is phosphorylated by glucose and GLP-1 in RIN 1046-38
cells.
Biochem Biophys Res Commun 238: 297-300, 1997

Lebenslauf

Name: Birgit Elisabeth Moormann
Geburtsdatum: 04. Januar 1973
Geburtsort: Nordhorn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: In Hohen Felde 2, 32425 Minden
Eltern: Dr. Josef Moormann, Arzt für Allgemeinmedizin i.R.
Erika Moormann, geb. Schröer, Lehrerin i.R.

Schule:

1979-1983: Grundschule Marienschule, Meppen
1983-1985: Orientierungsstufe Esterfeld, Meppen
1985-1992: Windthorst-Gymnasium, Meppen
18.05.1992: Abitur

Universität:

10/1992 - 4/1999: Studium der Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
09.09.1994: Ärztliche Vorprüfung
29.08.1995: 1. Staatsexamen
08.04.1998: 2. Staatsexamen
29.04.1999: 3. Staatsexamen
01.02.2001: Approbation

Berufliche Tätigkeit:

4/1998 - 4/1999: Praktisches Jahr, Klinikum Kassel, Wahlfach Neurologie
8/1999 - 3/2004: Arzt im Praktikum und Assistenzärztin, Neurologie,
Klinikum Minden;
3/2004 - 3/2005: Assistenzärztin, Psychiatrie, Fachabteilung Bad Rehburg
Seit 3/2005: Assistenzärztin, Neurologie, Klinikum Minden

Promotion:

1/1997: Beginn der Doktorarbeit mit dem Arbeitstitel: „Interaktion vom cAMP-Pfad und zytosolischem Calcium in B-Zellen des endokrinen Pankreas.“

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

in Marburg:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Beato, Engel, Eschenbach, Fuhrmann, Ganz, Geus, Göke, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Hilgermann, Huffmann, Joseph, Jungclas, Kaffarnik, Kalbfleisch, Kern, Kleine, Kleinsasser, Klenk, Klose, Kraus, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kummer, Lang, Lennartz, Maisch, Moosdorf, Müller, Netter, Oertel, Pfab, Pohlen, Remschmidt, Riedmiller, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schmidt-Moormann, Schüffel, Schulz, Schumacher, Scheifart, Seyberth, Slenczka, Steiniger, Thomas, v. Wichert

In Kassel:

Ferbert, Köhler, Neuhaus, Raible, Sons

Danksagungen

Bei Herrn PD Dr. med. Hans-Peter Bode möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete und intensive Betreuung, seine stets vorhandenen Diskussionsbereitschaft und sein außergewöhnliches Engagement bedanken.

Professor Fuhrmann möchte ich für die fruchtbaren Diskussionen danken.

Britta Volland, Regina Dabew und allen anderen Mitarbeitern möchte ich für die gute Zusammenarbeit, das freundliche Arbeitsklima und die besondere Unterstützung im Labor danken.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz herzlich bedanken für ihre immer währende Unterstützung in meinem Leben und bei meiner Ausbildung, sowie für den Ansporn, meine Pläne zu verwirklichen.

Ein besonderer Dank gebührt Michael für den Rückhalt, den er mir während des Schreibens meiner Arbeit gegeben hat, für seine aufmunternden Worte und seine Hilfe, mir alle anderen Aufgaben abzunehmen.

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Untersuchung zur Beteiligung von Proteinkinase A und Tyrosinkinase an der Calcium-abhängigen Signaltransduktion von Glucagon-like Peptide 1(7-36)amid in Insulin-sezernierenden Zellen des endokrinen Pankreas

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg, geschäftsführender Direktor Professor Dr. Gudermann, unter der Leitung von und mit der Unterstützung durch Privatdozent Dr. Hans-Peter Bode ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

H. P. Bode, B. Moormann, B. Göke: Cyclic AMP-mediated calcium elevation in insulin-secreting cells: stimulation by tyrosin kinase? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [Suppl] 355: 4, R64, Abstract 228; 1997

H.P. Bode, B. Moormann, R. Dabew, B. Göke: Glucagon-like peptide 1 elevates cytosolic calcium in pancreatic β -cells independently of protein kinase A. *Endocrinology*, 140: 3919-3927; 1999

Marburg, den 28. Juli 2005

Birgit Moormann