

**Mikrofluorimetrische Untersuchungen zur  
Charakterisierung der glucoseinduzierten langsamen  
Oszillationen der intrazellulären freien  
Calciumkonzentration in Pankreasinseln der Maus**

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

genehmigte Dissertation

von

**Dipl. Chem. Thomas Peckmann**

geboren am **09.11.1963** in **Langenhagen**

**Hannover 1999**

Referent: Prof. Dr. Sigurd Lenzen  
Koreferent: Priv. Doz. Dr. Walter Müller  
Tag der Promotion: 30. November 1998

Die Vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1994 bis Juli 1998 im Institut für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Sigurd Lenzen angefertigt. Ihm möchte ich an dieser Stelle für die umfassenden Arbeitsmöglichkeiten, sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie seine allzeitige Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse danken.

Herrn PD Dr. Müller danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Diese Arbeit wäre ohne die vielfältige Unterstützung der Mitarbeiter des Instituts nicht möglich gewesen.

Dr. Frank Diederichs, der jederzeit bemüht war mich in die Feinheiten der intrazellulären Calciumhomöostase einzuweißen.

Frau Anne Petzold für ihre Geduld bei meinen Eskapaden in der Zellkultur, sowie für ihre Mithilfe bei den Messungen.

Frau Ute Sommerfeld für die große Hilfe beim Ansetzen von Puffern und Lösungen.

Herrn Dr. Magnus Lerch für die Hilfe bei den Messungen und seine permanente gute Laune, die in vielen Momenten unschätzbare Dienste leistete.

Frau Dagmar Lischke für die Bereitstellung Ihres Erfahrungsschatzes beim „Inseln machen“.

Herrn Dr. Oscar Alcazar und Herrn Matthias Elsner für die helfenden Hände bei den radioaktiven Arbeiten.

Herrn PD Dr. Ingo Rustenbeck für die Bereitschaft meine Ergebnisse und Hypothesen kritisch zu diskutieren.

Frau Britta Lüken, Frau Anke Hager und Frau Maren Böger für Ihre Geduld mit mir, wenn ich wieder mal „die Bank aufmachen“ wollte oder mehr oder weniger intelligente Fragen gestellt habe.

Herrn Dr. Stephan Lortz, der auch beim dritten Absturz des Servers noch Ruhe bewahrte.

Den Mitarbeitern der Forschungswerkstätten der MHH danke ich für ihre Mitarbeit bei der Konstruktion aller von mir erdachten Geräte und ihre Bereitschaft meine Ideen als Hilfe aufzufassen und weitestgehend umzusetzen.

Zum Schluß möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, bei meinen Eltern und natürlich bei meiner Frau Kornelia und meinen Töchtern Carlotta und Paula, deren Geduld durch meine häufig lange Abwesenheit von zu Hause arg strapaziert wurde.

## **Abstract**

Eine Stimulation der Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas durch den physiologischen Stimulus Glucose löst eine Insulinsekretion aus, die begleitet wird von einer Erhöhung der freien intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Diese oszilliert sowohl in isolierten Langerhansschen Inseln als auch in Einzelzellen des Pankreas. Die Ursache für diese Oszillationen ist unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem neu aufgebauten mikrofluorimetrischen Meßsystem zur photometrischen und bildgebenden Datenerfassung der Einfluß von Glucose und verschiedenen anderen Stimulatoren der Insulinsekretion auf das oszillatorische Verhalten der  $[Ca^{2+}]_i$  untersucht in der Absicht, die zugrundeliegenden Mechanismen für die beobachteten Oszillationen aufzuklären.

A stimulation of beta-cells of pancreatic islets of langerhans with the psysiological stimulus glucose triggers insulin secretion which is accompanied by an increase of the intracellular free calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). This oscillates in isolated islets of langerhans and in single cells of the pancreas respectively. The origin of these oscillation is unknown. In the present work a new installed microfluorimetric device for photometric and visual data aquisition is used to investigate the influence of glucose and several other stimuli of insulin secretion on the oscillatory behaviour of  $[Ca^{2+}]_i$  in order to investigate the basic mechanisms.

**Schlüsselwörter** : Langerhanssche Inseln ;intrazelluläres Calcium ;Oszillationen

**Keywords** : Islets of Langerhans ;intracellular calcium; oscillations

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Insulin und Diabetes mellitus.....	1
1.2	Regulationsmechanismen der Insulinsekretion.....	2
1.2.1	Glucose und andere glykolytische Substrate.....	2
1.2.2	$\alpha$ -Ketoisocapronsäure .....	5
1.2.3	Blutzuckersenkende Sulfonylharnstoffderivate und D-Phenylalaninderivate .....	6
1.3	Oszillationen der Insulinkonzentration in vivo .....	8
1.4	Pulsatile Insulinsekretion in vitro.....	9
1.5	Metabolische Oszillationen.....	9
1.6	Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration .....	10
1.6.1	Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Langerhansschen Inseln .....	11
1.6.2	Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration in isolierten Beta-Zellen Langerhansscher Inseln .....	13
1.7	Fragestellung .....	15
2	Methoden und Materialien .....	16
2.1	Chemikalien und Medien .....	16
2.1.1	Chemikalien .....	16
2.1.2	Medien .....	17
2.1.2.1	Zellkulturmedien.....	17
2.1.2.2	Meßmedien .....	18
2.1.2.3	Fura-2/AM Inkubationsmedium .....	19
2.1.2.4	Fura-2/AM Stammlösung .....	19
2.1.2.5	Tolbutamid Stammlösung.....	20
2.1.2.6	Adrenalin Stammlösung .....	20
2.1.2.7	NBDP Stammlösung.....	21
2.1.2.8	Collagen-Lösung.....	21
2.2	Pankreasinseln und Zellkultur.....	21
2.2.1	Tiere .....	21
2.2.2	Isolierung von Langerhansschen Inseln .....	21

2.2.3	Präparation von Einzelzellen aus Langerhansschen Inseln.....	23
2.3	Zellkultur.....	23
2.3.1	Kultivierung von Langerhansschen Inseln.....	23
2.3.2	Kultivierung von Einzelzellen aus Langerhansschen Inseln.....	24
2.4	Mikroskop.....	24
2.4.1	Temperierbares Objektiv.....	24
2.4.2	Lichtleitereinkoppelung.....	25
2.4.3	Dichroitischer Strahlteiler.....	25
2.4.4	View-Finder.....	25
2.5	Temperierung und Umströmungsapparatur.....	26
2.5.1	Meßkammer.....	26
2.5.2	Temperierung des Objektträgers.....	26
2.5.3	Temperierung der Zuflüsse.....	27
2.5.4	Pump- und Ventilsystem.....	27
2.5.5	Positionierung der Zuflüsse in der Meßkammer.....	28
2.6	Ca <sup>2+</sup> Analytik.....	28
2.6.1	Ca <sup>2+</sup> sensitive Fluoreszenzindikatoren.....	29
2.6.2	Der Ca <sup>2+</sup> -Indikator Fura-2.....	30
2.6.3	Inkubation mit dem Fluorophor FURA-2.....	32
2.6.4	Durchführung der Ca <sup>2+</sup> Messung.....	32
2.6.5	Ca <sup>2+</sup> Kalibrierung.....	33
2.6.6	Monochromator.....	33
2.6.7	Photometrisches Meßsystem.....	33
2.6.8	Imaging Meßsystem.....	34
2.7	Datenaufnahme und -verarbeitung.....	35
2.7.1	Photometrisches System.....	35
2.7.2	Imaging System.....	35
2.7.3	Validität des Meßsystems.....	36
2.7.4	Datenvisualisierung und Auswertung.....	38
2.8	Glucoseoxidation.....	39
3	Resultate.....	40

3.1 Einfluß von Stoffwechselfsubstraten auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln der Maus.....	40
3.1.1 Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen (10-40 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	40
3.1.1.1 Abhängigkeit der Frequenz der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ und der mittleren Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln von der Glucosekonzentration .....	44
3.1.1.2 Einfluß von Mannoheptulose auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit 10 oder 15 mM Glucose.....	47
3.1.1.3 Einfluß von Adrenalin auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	49
3.1.1.4 Kombiniertes Einfluß von Adrenalin und Mannoheptulose auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	53
3.1.1.5 Einfluß einer hohen extrazellulären Kaliumkonzentration auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	55
3.1.2 Einfluß von Mannose auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Isolierte Pankreasinseln.....	56
3.1.2.1 Vergleich der Frequenzen von mannose- und glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	57
3.1.3 Einfluß verschiedener Glycerinaldehydkonzentrationen (3 und 10 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln.....	58
3.1.3.1 Einfluß verschiedener Glycerinaldehydkonzentrationen (3 und 10 mM) in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen (5 und 10 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln.....	60
3.1.3.2 Abhängigkeit der Frequenz der durch Glycerinaldehyd plus Glucose induzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln von der Glucosekonzentration .....	63
3.1.3.3 Einfluß von Mannoheptulose auf die langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit Glycerinaldehyd (3 mM) plus Glucose (5 mM).....	64

3.1.3.4 Einfluß von Adrenalin auf die langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit Glycerinaldehyd (3 mM) plus Glucose (5 mM) .....	66
3.1.4 Einfluß verschiedener Konzentrationen von $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln.....	67
3.1.4.1 Einfluß verschiedener Konzentrationen von $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) (5 und 10 mM) in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen (5 und 10 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	69
3.1.4.2 Einfluß von Mannoheptulose auf die Antwort der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) (5 oder 10 mM) plus Glucose (5 oder 10 mM).....	72
3.1.4.3 Einfluß von Adrenalin auf die Antwort der $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) (5 oder 10 mM) in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen (5 oder 10 mM).....	75
3.1.4.4 Kombiniertes Einfluß von Adrenalin und Mannoheptulose auf die Antwort der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) plus Glucose in Pankreasinseln.....	78
3.1.5 Einfluß von Pyruvat und Methylpyruvat auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln.....	79
3.1.5.1 Einfluß von Pyruvat (10 mM) und Methylpyruvat (10 mM) plus Glucose auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	81
3.1.6 Einfluß von Tolbutamid auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln.....	83
3.1.6.1 Einfluß von Tolbutamid (200 $\mu$ M) in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen (5-20 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	84
3.1.6.2 Abhängigkeit der Frequenz der in Gegenwart von Tolbutamid von Glucose induzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ und der mittleren $[Ca^{2+}]_i$ von der Glucosekonzentration .....	87
3.1.6.3 Einfluß von Mannoheptulose auf die langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit Tolbutamid (200 $\mu$ M) plus Glucose .....	89



3.1.6.4 Einfluß einer hohen Tolbutamidkonzentration (800 µM) auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	92
3.1.6.5 Einfluß von Tolbutamid (200 µM) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	93
3.1.7 Einfluß von N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	95
3.1.7.1 Einfluß von N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP) (200 µM) in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen (5-20 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln.....	96
3.1.7.2 Abhängigkeit der Frequenz der von N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP) plus Glucose induzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln von der Glucosekonzentration .....	99
3.1.7.3 Abhängigkeit der mittleren Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln nach Stimulation mit N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP) von der Glucosekonzentration .....	101
3.1.7.4 Einfluß einer hohen N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP)-Konzentration (800 µM) plus Glucose (15 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln.....	102
3.1.8 Einfluß von Antazolin auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln.....	103
3.1.8.1 Einfluß von Antazolin (25 µM) in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen (10 oder 20 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	104
3.1.8.2 Abhängigkeit der Frequenz der von Antazolin plus Glucose induzierten langsamen Oszillationen $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln von der Glucosekonzentration .....	106
3.1.9 Einfluß von Carbamylcholin auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln.....	107
3.1.9.1 Einfluß von Carbamylcholin (50 µM) in von Glucose (10 oder 15 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln.....	108
3.1.9.2 Einfluß von 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	110

3.2	Einfluß von verschiedenen Stoffwechselsubstraten auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Beta-Zellen des Pankreas der Maus .....	111
3.2.1	Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen (10-20 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Beta-Zellen des Pankreas.....	111
3.2.1.1	Abhängigkeit der Frequenz der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Beta-Zellen des Pankreas von der Glucosekonzentration .....	113
3.2.1.2	Vergleich des Musters der langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ von isolierten Beta-Zellen und Clustern von Beta-Zellen des Pankreas nach Stimulation mit Glucose (10 mM).....	114
3.2.2	Einfluß von $\alpha$ -Ketoisocaprionsäure (KIC) (5 mM) plus Glucose (10 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Beta-Zellen des Pankreas .....	117
3.2.2.1	Einfluß von Tolbutamid (200 $\mu$ M) plus Glucose (10 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Beta-Zellen des Pankreas .....	118
3.2.2.2	Einfluß von N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP) (200 $\mu$ M) plus Glucose (10 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Beta-Zellen des Pankreas.....	119
3.3	Einfluß verschiedener Nährstoffen und anderen Substanzen mit insulinsekretorischer Wirkung auf die Oxidation von $[U-^{14}C]$ -Glucose in isolierten Pankreasinseln der Maus.....	120
4	Diskussion.....	121
4.1	Einfluß von Glucose und Mannose auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln der Maus .....	122
4.2	Einfluß von anderen Substanzen mit Nährstoffcharakter auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln der Maus.....	124
4.3	Einfluß von anderen Substanzen mit Nährstoffcharakter auf glucoseinduzierte langsame Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln der Maus .....	126
4.4	Einfluß von blutzuckersenkenden Sulfonylharnstoffen und analog wirkenden Substanzen auf die Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	129
4.5	Einfluß von hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen auf die langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln .....	132
4.6	Einfluß von Adrenalin auf die langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln.....	133
5	Zusammenfassung.....	140

6 Literaturverzeichnis..... 142

---

## 1 Einleitung

### 1.1 Insulin und Diabetes mellitus

Das blutzuckersenkende Hormon Insulin ist von zentraler Bedeutung für die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels (*Waldhäusl & Lenzen 1998*). Insulin ist ein Peptidhormon (51 Aminosäuren), das aus zwei Ketten, der A-Kette (21 Aminosäuren) und der B-Kette (30 Aminosäuren) besteht. Die beiden Ketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Insulin wird im Pankreas (in der Bauchspeicheldrüse) von den Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln produziert. Langerhanssche Inseln sind endokrine Zellhaufen innerhalb des exokrinen Anteils des Pankreas. Sie bestehen beim Menschen aus 500 bis 2000 Zellen und machen 2-5 % der Gesamtmasse des Pankreas aus. Die Langerhansschen Inseln sind aus vier verschiedenen Zelltypen aufgebaut: Alpha-Zellen (Anteil 10-20 %), Beta-Zellen (70-90 %) sowie Delta-Zellen (unter 10 %) und PP-Zellen (unter 1 %). Alle vier Zelltypen produzieren Peptide und setzen diese in Sekretgranula gespeicherten Proteine durch Exozytose frei. Beta-Zellen produzieren Insulin, Alpha-Zellen Glucagon, Delta-Zellen Somatostatin und PP-Zellen das Pankreatische Polypeptid. Die Peptide werden in das intrainsuläre Kapillarsystem abgegeben. Obwohl alle Gewebe Insulinrezeptoren aufweisen, sind die wichtigsten Zielorgane des Insulins die Leber, die Muskulatur und das Fettgewebe. Insulin senkt die Blutzuckerkonzentration durch eine Steigerung des Glucoseverbrauchs in der Muskulatur und unterdrückt die Glykogenolyse und die Gluconeogenese in der Leber sowie die Lipolyse im Fettgewebe.

Ein Mißverhältnis zwischen Insulinbedarf und Insulinproduktion manifestiert sich als Diabetes mellitus. Dabei handelt es sich um die häufigste Stoffwechselerkrankung. Beim Diabetes mellitus werden im wesentlichen zwei Formen unterschieden: der Typ I Diabetes oder Insulinmangeldiabetes und der Typ II Diabetes. Beim Typ I Diabetes kommt es zu einer Zerstörung der Beta-Zellen des Pankreas, z.B. nach einem Autoimmunangriff, und somit zum Versiegen der Insulinsekretion. Der Typ IIa Diabetes ist nicht die Folge einer verminderten Insulinsekretion, sondern primär einer Insulinresistenz der Zielorgane. Dieser liegt die Abnahme der Insulinwirkung ursächlich zugrunde. Dazu können neben einer Abnahme von Insulinrezeptoren, Postrezeptordefekte sowie ein Verlust oder eine Veränderung der Pulsatilität der Insulinsekretion beitragen. Dem Typ IIb Diabetes oder

Altersdiabetes liegt ein Insulinmangel zugrunde, bei dem die Beta-Zellen des Pankreas nicht mehr in der Lage sind, auf einen Stimulus mit der Freisetzung einer adäquaten Insulinmenge zu reagieren.

## 1.2 Regulationsmechanismen der Insulinsekretion

Glucose ist der wesentliche physiologische Stimulus der Insulinsekretion. Zusätzlich kann die Insulinsekretion auch durch andere Nährstoffe, nämlich bestimmte Aminosäuren (z.B. Leucin) und, bei einigen Spezies, durch freie Fettsäuren stimuliert werden. Neben diesen physiologischen Stimuli gibt es weitere Substanzen, z.B. Glycerinaldehyd, ein intermediäres Produkt der Glykolyse, sowie  $\alpha$ -Ketoisocaproinsäure, das Desaminierungsprodukt der Aminosäure Leucin, die eine Insulinfreisetzung bewirken. Diesen Substanzen kommt jedoch keine physiologische Bedeutung zu. Außer diesen Stimuli mit Nährstoffcharakter, die das Signal für die Insulinsekretion in ihrem Stoffwechsel bilden, gibt es andere, die direkt mit Strukturen in der Zellmembran interagieren und so eine Insulinsekretion auslösen. Zu diesen Substanzen zählen blutzuckersenkende Sulfonylharnstoffderivate (z.B. Tolbutamid, Glibenclamid), die in der Therapie des Altersdiabetes als orale Antidiabetika Anwendung finden. Darüber hinaus gibt es noch eine Reihe verschiedener anderer Substanzen, wie Peptide und Neurotransmitter, welche die Insulinsekretion vorwiegend modulieren (*Übersicht bei Waldhäusl & Lenzen 1998*).

### 1.2.1 Glucose und andere glykolytische Substrate

Das Signal für die glucoseinduzierte Insulinsekretion entsteht im Stoffwechsel der Glucose. Entscheidend ist eine Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten in den Beta-Zellen des Pankreas (*Dunne & Petersen 1986*). Das ATP aus dem Intermediärstoffwechsel der Glucose dient sowohl als Energieträger als auch als auslösendes Signal für die Insulinsekretion. Aufgrund der Hydrophilie von Glucose und allen anderen Monosacchariden sind diese für die Passage durch die Zellmembran auf sogenannte Glucosetransporter angewiesen. In der Beta-Zelle dient hierzu im Bereich millimolarer Konzentrationen der niedrigaffine GLUT2 Glucosetransporter, der auf dem Wege der erleichterten Diffusion einen Ausgleich der extra- und intrazellulären Glucosekonzentration bewerkstelligt (*Waldhäusl & Lenzen 1998*). Die zweite, für die Signalerkennung zentral relevante Struktur der Beta-Zelle ist die Glucokinase Neben den hochaffinen Hexokinaseisoenzymen vom Typ I bis III mit  $K_m$ -

---

Werten im mikromolaren Konzentrationsbereich, die sich in praktisch allen Geweben finden, verfügt die Beta-Zelle des Pankreas als einziges Organ neben der Leber über ein niedrigaffines glucosephosphorylierendes Enzym, die Hexokinase IV (= Glucokinase) (Lenzen & Panten 1988). Neben der niedrigen Glucoseaffinität wird die Glucokinase, im Gegensatz zu den anderen Hexokinasetypen, nicht durch ihr Produkt Glucose-6-phosphat inhibiert und ermöglicht in den Beta-Zellen des Pankreas somit einen permanenten glykolytischen Flux. Durch die Phosphorylierung der Glucose im millimolaren Konzentrationsbereich wird ein erhöhter Stoffwechselflux erzeugt, so daß die ATP-Konzentration bei gleichzeitiger Verringerung der ADP-Konzentration ansteigt. Das ATP bindet an einen speziellen ATP-sensitiven Kaliumkanal ( $K_{ATP}$ -Kanal, KIR6.2) in der Zellmembran der Beta-Zelle (Tucker *et al.* 1997). Dieser Kanal ist unter Ruhebedingungen geöffnet und schließt unter dem Einfluß einer erhöhten ATP-Konzentration, woraus eine Depolarisierung der Zellmembran resultiert. In Folge dieser Depolarisierung öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle und ermöglichen einen Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol. Der so ausgelöste Anstieg der intrazellulären freien Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) stellt in Beta-Zellen den letzten Schritt zur Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion dar, indem er, durch einen noch nicht in allen Einzelheiten bekannten Mechanismus, die Exozytose der Insulingranula auslöst. Diese vier geschilderten Strukturen der Beta-Zelle, GLUT2 Glucosetransporter, Glucokinase,  $K_{ATP}$ -Kanal und spannungsabhängiger Calciumkanal, bilden in ihrem Zusammenspiel den Signalweg von der Glucoseerkennung bis zur bedarfsgerechten Sekretion des Insulins. Abbildung 1 zeigt eine Übersicht der bei der Insulinsekretion beteiligten Prozesse.

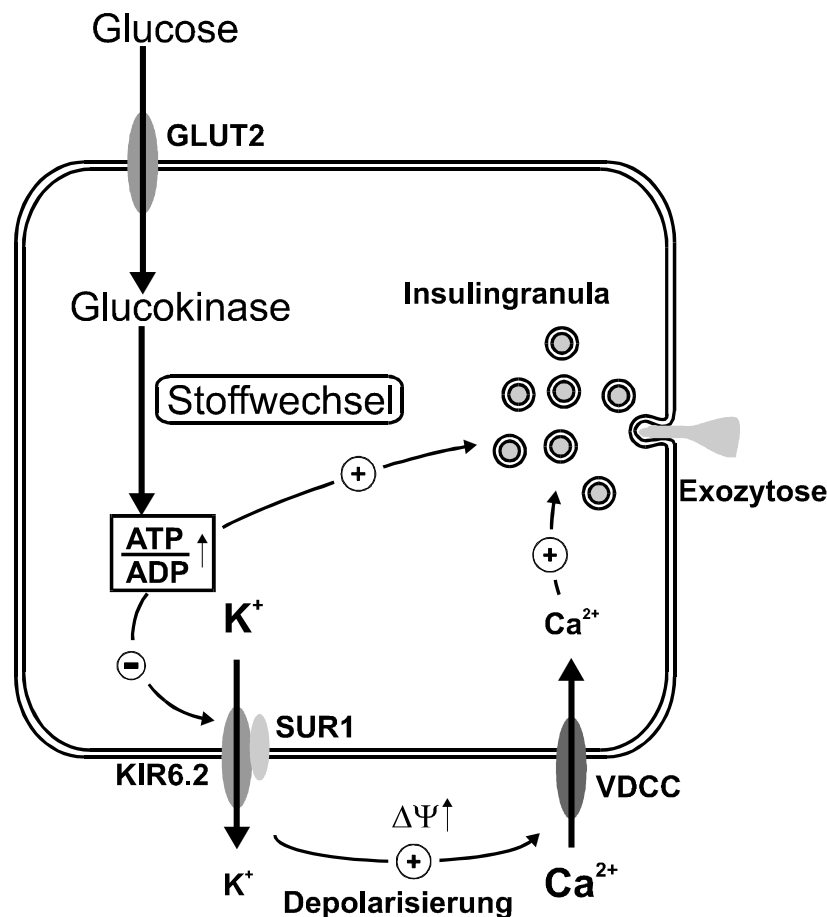


Abb. 1: Schematische Darstellung des Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion

(GLUT2 : Glucosetransporter, KIR6.2 : ATP-sensitiver Kaliumkanal; SUR1 : Sulfonylharnstoffrezeptor;  $\Delta\Psi$  : Membranpotential, VDCC : spannungsabhängiger Calciumkanal)

Neben Glucose ist die Hexose Mannose ein wenn auch schwacher Stimulus der Insulinsekretion. Der Mechanismus der durch Mannose induzierten Insulinsekretion ist dabei im Prinzip identisch mit dem der Glucose. Der Unterschied zur Glucose liegt im  $K_m$ -Wert der Glucokinase für Mannose, der erheblich höher ist als für Glucose. Daher ist bei vergleichbarer Konzentration beider Hexosen der durch Mannose ausgelöste Stoffwechselflux geringer, woraus eine geringere ATP-Produktion und Insulinsekretionsrate resultiert.

Als weiteres glykolytisches Substrat kann D-Glycerinaldehyd eine Insulinsekretion auslösen. Glycerinaldehyd ist das erste Triose-Intermediat der Glykolyse und verfügt über eine potentere insulinsekretorische Wirksamkeit als Glucose. Der genaue Mechanismus der Insulinsekretion durch Glycerinaldehyd ist nicht bekannt. Es wird bei exogener Gabe zum Teil durch die Triokinase zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (MacDonald 1989)

phosphoryliert und dann als solches in die Glykolyse eingeschleust was über die beschriebene Signalkaskade zur Auslösung der Insulinsekretion führt. MacDonald (1989) schränkt dieses Modell jedoch ein, da die Triokinase in der Beta-Zelle offenbar nur eine geringe Aktivität aufweist, die nicht mit der insulinsekretorischen Wirksamkeit von Glycerinaldehyd im Einklang steht. Er verweist auf alternative Stoffwechselwege, die von der Glykolyse abzweigen, z.B. den Glycerin-3-phosphat-Shuttle (MacDonald & Fahien 1988).

Das Endprodukt der Glykolyse, das selbst zwar keine Insulinsekretion bewirkt, diese jedoch in Gegenwart von Glucose verstärkt, ist das Pyruvat (Salz der Brenztraubensäure) (Lenzen & Panten 1981). Um die Wirkung von Pyruvat besser untersuchen zu können, wurde zusätzlich der korrespondierende Methylester verwendet, der im Gegensatz zu freien Säure bzw. dem Natriumsalz eine insulinsekretorische Wirkung aufweist (Malaisse et al. 1996). Die Tatsache, daß Methylpyruvat im Gegensatz zu Pyruvat insulinsekretorisch wirksam ist, konnte noch nicht völlig geklärt werden. Es wird jedoch angenommen, daß der Ester aufgrund seiner größeren Lipophilie leichter von der Zelle aufgenommen werden kann als Pyruvat (Malaisse et al. 1996). Das Pyruvat ist das Endprodukt der Glykolyse und wird als Acetyl-CoA in den Citratzyklus aufgenommen. Auf diese Weise wird die ATP-Produktion erhöht, was letztlich in einer Insulinsekretion mündet.

### 1.2.2 $\alpha$ -Ketoisocapronsäure

$\alpha$ -Ketosäuren sind die Desaminierungsprodukte von Aminosäuren, die aus einer Transaminierungsreaktion hervorgehen.  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC), das Desaminierungsprodukt von Leucin, ist neben Glucose einer der wenigen Nährstoffe, der insulinsekretorisch wirksam ist (Panten et al. 1972; Lenzen 1978; Lenzen & Panten 1980). Der weitere Abbau von KIC über Acetoacetat und Acetyl-CoA mündet in den Citratzyklus ein und führt auf diesem Weg zu einer Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten (Hutton et al. 1980), was auf die schon beschriebene Weise über eine Interaktion mit dem  $K_{ATP}$ -Kanal zur Auslösung einer Insulinsekretion führt (Ashcroft et al. 1987). Dieser Sekretionsmechanismus vermittelt eine Steigerung der ATP-Produktion (Lembert & Idahl 1998) über die Metabolisierung von KIC erfordert die Verfügbarkeit von Glutamin. Dies ermöglicht die Generierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat durch Transaminierung mit Glutamat (Lenzen et al. 1982; Lenzen et al. 1985;



---

*Lenzen et al. 1986*), welches zusammen mit Acetoacetat einen erhöhten Stoffwechselfluß durch den Citratzyklus zum Zwecke der ATP-Generierung unterhält.

### 1.2.3 Blutzuckersenkende Sulfonylharnstoffderivate und D-Phenylalaninderivate

Im Gegensatz zu den Stimulatoren der Insulinsekretion mit Nährstoffcharakter, deren Wirkungsweise über eine Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten mit ihrem Einfluß auf die Öffnungswahrscheinlichkeit des  $K_{ATP}$ -Kanals zu erklären ist, wirken blutzuckersenkende Sulfonylharnstoffderivate (*Panten et al. 1996*) und blutzuckersenkende D-Phenylalaninderivate (*Shinkai et al. 1988*) direkt am Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1) der Beta-Zellen des Pankreas (*Panten et al. 1996*), einem mit dem  $K_{ATP}$ -Kanal assoziierten separaten Protein in der Zellmembran (*Tucker et al. 1997*). Die Bindung dieser Substanzen an den Rezeptor bewirkt eine Schließung des Kanals, woraus eine Depolarisierung der Zellmembran resultiert, welche die schon beschriebenen spannungsabhängigen Calciumkanäle öffnet. Die so einströmenden Calciumionen erhöhen die  $[Ca^{2+}]_i$  (*Shinkai et al. 1988*; *Grapengiesser et al. 1990*) und lösen sodann eine Insulinsekretion aus (*Panten et al. 1996*; *Fujitani et al. 1996*). Dieser Wirkungsmechanismus ist für Sulfonylharnstoffe sehr gut charakterisiert (*Panten et al. 1996*). Die genaue Wirkungsweise der Phenylalaninderivate, deren insulinsekretorische Wirksamkeit erst vor ein paar Jahren festgestellt wurde (*Fujitani & Yada 1994*), ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Alle verfügbaren Daten weisen jedoch auf eine den blutzuckersenkenden Sulfonylharnstoffderivaten vergleichbare Wirkungsweise hin (*Schwanstecher et al. 1998*).

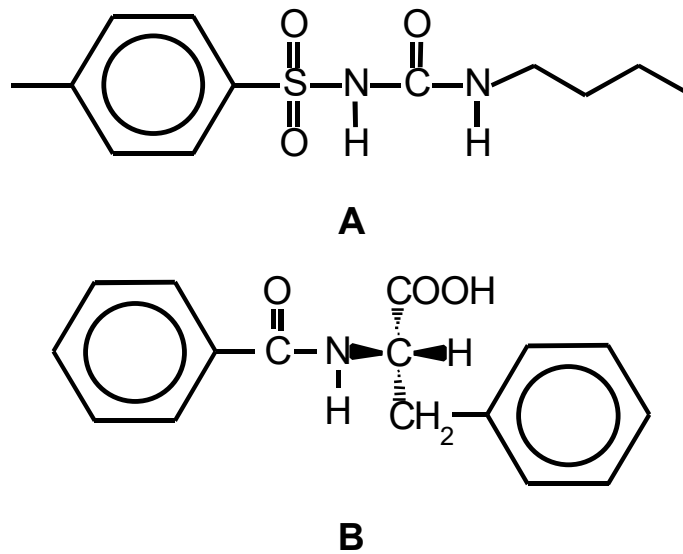


Abb 2: Strukturformeln von Tolbutamid (A) und NBDP (B)

Bei dem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1) der Beta-Zelle des Pankreas handelt es sich um ein separates mit  $K_{ATP}$ -Kanal assoziiertes Membranprotein. Während die blutzuckersenkenden Sulfonylharnstoffe wie auch die NBDP-Derivate an den SUR1 binden und somit eine Schließung des Kanals mit nachfolgender Depolarisation der Plasmamembran induzieren, bindet das im Stoffwechsel von Insulinstimulatoren mit Nährstoffcharakter entstehende ATP an eine auf dem Kaliumkanal selbst befindliche Bindungsstelle. Darüber hinaus gibt es an dem Kanalprotein eine weitere separate Bindungsstelle für Mg-ADP. Das erklärt, warum der ATP/ADP-Quotient letztlich für die Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Kaliumkanals verantwortlich ist. Die unterschiedlichen Bindungsstellen für die Nukleotide am Kanalprotein selbst und die verschiedenen blutzuckersenkenden Pharmaka am mit dem Kanal assoziierten SUR1 Rezeptorprotein bieten die Möglichkeit für komplexe Regulationsprozesse an diesem Rezeptor-Kanal-Proteinkomplex.

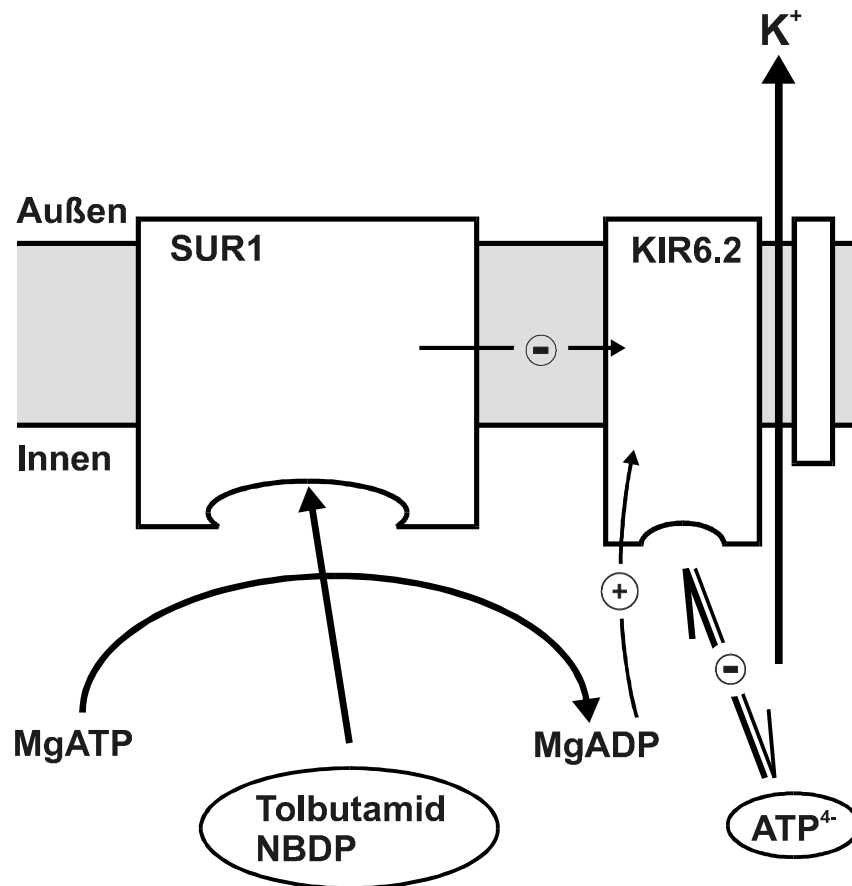


Abb. 3: Schematische Darstellung der Regulation des ATP-sensitiven Kaliumkanals (KIR6.2) über den ATP/ADP-Quotienten sowie den Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1).

### 1.3 Oszillationen der Insulinkonzentration in vivo

Seit nahezu 20 Jahren ist bekannt, daß die Insulinkonzentration in der Zirkulation bei vielen Spezies in vivo regelmäßige Oszillationen aufweist (Goodner et al. 1977; Lang et al. 1979; Übersicht bei Tornheim 1997). Diese Oszillationen zeichnen sich durch bestimmte Charakteristika aus (Tornheim 1997). Beim Menschen beträgt die Periode dieser Oszillationen ca. 13 Minuten (O'Rahilly et al. 1988). Parallel dazu schwankt die Blutglucosekonzentration mit der gleichen Frequenz, weist jedoch eine Phasenverschiebung von ca. 2 Minuten auf (Goodner et al. 1977). Die Frequenz dieser Oszillationen ändert sich nach Nahrungsaufnahme nicht, lediglich ihre Amplitude nimmt zu. Die Oszillationen werden auch durch Pharmaka ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Blocker, Endorphine, Anästhetika) nicht verändert. Beim Diabetes mellitus, insbesondere dem Typ IIa (siehe Kapitel 1.1), ändert sich das

Muster der Oszillationen der Insulinkonzentration (*O'Rahilly et al. 1988*). Bei Patienten mit diesem nicht insulinabhängigen Diabetes wurde eine irreguläre oder verlängerte Periodizität der Oszillationen der Insulinkonzentration beobachtet (*Weigle 1987; Lefebvre et al. 1987*). Die Ursache für diese Oszillationen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Ein neuronaler Auslöser gilt jedoch als unwahrscheinlich, da ähnliche Oszillationen der Insulinsekretion auch am isolierten Pankreas und an isolierten Langerhansschen Inseln zu beobachten sind (siehe Kapitel 1.4).

#### **1.4 Pulsatile Insulinsekretion in vitro**

Auch in vitro werden bei Stimulation mit Glucose regelmäßige Oszillationen der Insulinsekretion beobachtet. Dies gilt sowohl für das isolierte Pankreas (*Stagner & Samols 1985*) als auch für isolierte Langerhanssche Inseln (*Bessman et al. 1973; Longo et al. 1991; Gilon & Henquin 1992*). Bei Perfusion isolierter Pankreata wurden nach Stimulation mit Glucose Oszillationen der Insulinsekretion mit einer Periode von 5-7 Minuten beobachtet (*Stagner & Samols 1985*). Dabei zeigte sich, daß die Periodizität der Insulinsekretion unabhängig von der Glucosekonzentration war (*Lefebvre et al. 1987*). Isolierte Langerhanssche Inseln zeigen ebenfalls Oszillationen der Insulinsekretion. Die Periode liegt bei 1-5 Minuten (*Hellman et al. 1994*). Ob auch isolierte Beta-Zellen Langerhansscher Inseln eine pulsatile Insulinsekretion aufweisen, kann derzeit nur vermutet werden, da diese bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde.

#### **1.5 Metabolische Oszillationen**

Spontane Oszillationen der Stoffwechselaktivität wurden in verschiedenen Geweben und Zelltypen beobachtet. Dazu gehören Skelett- und Herzmuskelextrakte, Hefen und ihre Extrakte sowie verschiedene Tumorzelllinien (*Tornheim 1997*). Untersuchte Parameter waren der Sauerstoffverbrauch, verschiedene Stoffwechselintermediate der Glykolyse (Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat bzw. Fructose-1,6-bisphosphat) (*Tornheim 1988*) sowie der ATP/ADP-Quotient (*Berridge & Galione 1988*). Dabei zeigte sich, daß die Oszillationsfrequenz des Sauerstoffverbrauchs in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte gut mit der Frequenz der pulsatilen Insulinsekretion übereinstimmte (*Longo et al. 1991*). Auch die Oszillationsfrequenz glykolytischer Intermediate und des ATP/ADP-Quotienten in Muskelextrakten ähnelt derjenigen der Insulinsekretion (*Tornheim 1988*). Die

Oszillationen des Lactatausstroms (*Chou et al. 1992*) und der NADH Fluoreszenz (*Pralong et al. 1990*) in isolierten Beta-Zellen weisen ebenfalls auf ein Vorhandensein glykolytischer Oszillationen in diesen Zellen hin. Auch konnte gezeigt werden, daß der ATP/ADP-Quotient, die Glucose-6-phosphat Konzentration (*Nilsson et al. 1996*) sowie der Sauerstoffverbrauch (*Longo et al. 1991*) in Suspensionen von Beta-Zellen einen oszillatorischen Verlauf aufweisen. An einzelnen Beta-Zellen konnte darüber hinaus eine oszillatorische Aktivität des  $K_{ATP}$ -Kanals nachgewiesen werden (*Tornheim 1997*).

Diesen Oszillationen könnte eine zyklische Aktivierung und Deaktivierung der Phosphofruktokinase zugrunde liegen (*Tornheim 1997*). Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß die Abnahme der Hexosemonophosphate mit einer Zunahme von Fructose-1,6-bisphosphat, dem Produkt der Phosphofruktokinase, einhergeht (*Tornheim 1988*). Weiterhin ist bekannt, das dieses Enzym, neben anderen Stoffwechselprodukten, durch ATP und Citrat gehemmt und durch ADP aktiviert wird.

## 1.6 Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration

Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) sind weit verbreitet und treten sowohl in nicht differenzierten (Oocyten) als auch in differenzierten Zellen auf. Dabei zeigen Frequenz und Form der Oszillationen viele Variationen. Auch die Stimuli, durch die diese Oszillationen ausgelöst werden können, sind sehr unterschiedlicher Natur (Neurotransmitter, Hormone, Wachstumsfaktoren) (*Berridge & Galione 1988*). Bestimmte Oszillationstypen sind so charakteristisch für einen bestimmten Zelltyp, daß sie sogar als „Fingerabdruck“ dienen könnten (*Prentki et al. 1988*).

Spontane Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  können grundsätzlich in zwei Kategorien unterteilt werden: (1) Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol und (2) Calciumausstrom aus intrazellulären Kompartimenten in das Zytosol (*Hess 1997*). Der Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol wird durch die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle bewirkt. Die Aktivität dieser Kanäle reflektiert die Depolarisierung der Zellmembran infolge der Schließung von Kaliumkanälen. Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  werden durch Öffnen und Schließen der Kaliumkanäle und die damit einhergehenden Schwankungen des Membranpotentials ausgelöst. Der Rücktransport der in das Cytosol eingeströmten  $Ca^{2+}$ -Ionen in den Extrazellulärraum erfolgt in der Beta-Zelle des Pankreas im Wesentlichen mit Hilfe einer in der Plasmamembran befindlichen

Calcium-ATPase (Pershadsingh *et al.* 1980; Kotagal *et al.* 1985). Diese ATPase transportiert  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit hoher Selektivität unter Energieverbrauch durch die Plasmamembran (Übersichten bei Prentki & Matschinsky 1987; Erecinska *et al.* 1992). Einen gegenüber der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase geringeren Anteil am Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Cytosol in den Extrazellulärraum hat ein  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Siegel *et al.* 1980), der durch den über die Plasmamembran vorhandenen Na-Gradienten angetrieben wird.

Eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch einen Calciumausstrom aus intrazellulären Kompartimenten, insbesondere aus dem endoplasmatischen Retikulum, ist häufig an die Erhöhung der Konzentration von Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) gekoppelt. Oszillationen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  resultieren dabei aus Schwankungen der  $\text{IP}_3$ -Konzentration. Untersuchungen an verschiedenen Geweben, u.a. auch an Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln, haben Hinweise darauf erbracht, daß dabei eine calciumabhängige Rückkopplung auf Calciumkanäle eine Rolle spielen könnte (Tornheim 1997; Hess 1997).

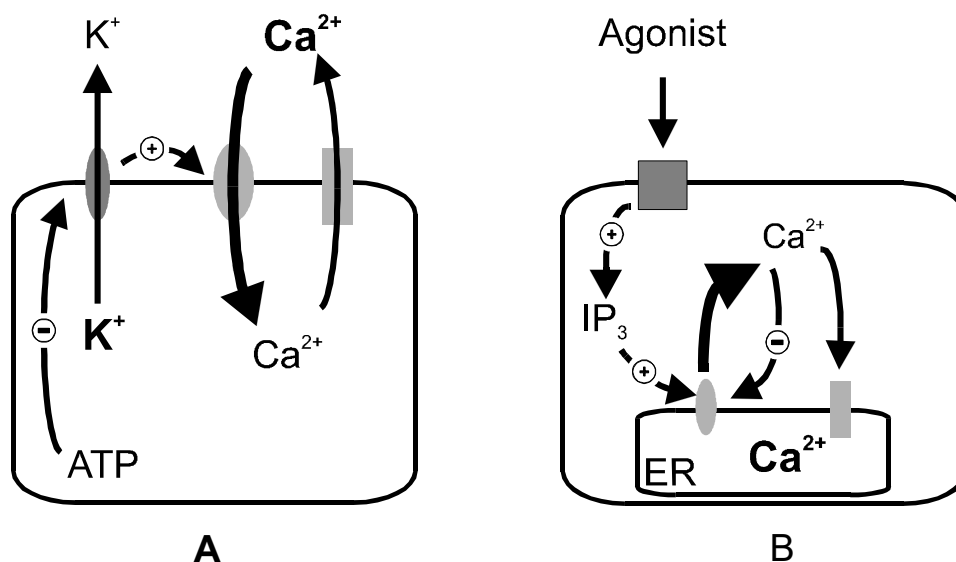


Abb. 4 : Mechanismen des Calciumeinstroms in das Zytosol (modifiziert nach Hess 1997)

A : ATP vermittelter Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol

B : Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) vermittelter Ausstrom von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in das Zytosol

### 1.6.1 Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in isolierten Langerhansschen Inseln

Glucoseinduzierte Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) wurden in isolierten Pankreasinseln der Maus (Rosario *et al.* 1986; Grapengiesser *et al.*

1988; Valdeolillos *et al.* 1989), der Ratte (Longo *et al.* 1991) und des Menschen (Kindmark *et al.* 1994; Hellman *et al.* 1994; Martin & Soria 1996) beobachtet.

Pankreasinseln der Maus zeigen unter Glucosestimulation einen biphasischen Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$ . Zunächst kommt es zu einem transienten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Inselzellen, dem sich eine zweite Phase mit spontanen, regelmäßigen Oszillationen auf einem erhöhten Konzentrationsniveau anschließt. Bei Stimulation mit Glucose im Konzentrationsbereich von 10-20 mM können sowohl regelmäßige Oszillationen mit geringer ( $0,3-0,9 \text{ min}^{-1}$ ) als auch hoher ( $2-7 \text{ min}^{-1}$ ) Frequenz auftreten (Hellman *et al.* 1992). Dabei überwiegt in den Pankreasinseln der Maus der Anteil der Inseln mit regelmäßigen Oszillationen (ca. 80 %) gegenüber diejenigen, die unregelmäßige oder keine Oszillationen (ca. 20 %) aufweisen (Hellman *et al.* 1992). Der Grund für ein Auftreten von unregelmäßigen Oszillationen oder für das vollständige Ausbleiben in einer Minderheit der Inseln ist unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß die Zeitdauer der Kultivierung der Inseln eine Rolle spielt (Gilon *et al.* 1994). Isolierte Pankreasinseln des Menschen zeigen nach einer Stimulation mit 11 mM Glucose ein vergleichbares oszillatorisches Verhalten wie für Inseln der Maus beschrieben (Kindmark *et al.* 1994; Hellman *et al.* 1994; Martin & Soria 1996).

Neben Glucose führen noch eine Reihe anderer Substanzen, die auch eine Insulinsekretion auslösen (siehe Kapitel 1.2), zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ , wie jene nach Glucosestimulation, wurden jedoch nur für Glycerinaldehyd (20 mM) (Roe *et al.* 1994),  $\alpha$ -Ketoisocaproinsäure (5 mM) (Martin *et al.* 1995) und verschiedene Aminosäuren (Martin & Soria 1995) beschrieben. Pyruvat löst keine Oszillationen aus, während der insulinsekretorisch wirksame Ester Methylpyruvat zwar eine Konzentrationserhöhung, jedoch keine Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  bewirkt (Mertz *et al.* 1996). Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ , die durch blutzuckersenkende Sulfonylharnstoffderivate (z.B. Tolbutamid oder Glibenclamid) induziert werden, wurden bisher nicht beschrieben. Lediglich in Gegenwart von niedrigen oder mittleren Glucosekonzentrationen (3-10 mM) vermochten diese Substanzen langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  zu induzieren (Grapengiesser *et al.* 1990).

Dem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  liegt der Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum durch spannungsabhängige Calciumkanäle infolge Depolarisation der Plasmamembran zugrunde (Abb. 1). Diese Annahme wird gestützt durch Befunde mit Substanzen ohne Nährstoffcharakter wie blutzuckersenkende Sulfonylharnstoffderivate, die über einen analogen Mechanismus wirken. Diese bewirken durch Interaktion mit dem Sulfonylharn-

stoffrezeptor die Schließung von ATP-sensitiven Kaliumkanälen (Abb. 1), ebenso wie hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen (15-40 mM), welche die Zelle direkt depolarisieren und somit die Öffnung der spannungsabhängigen Calciumkanäle auslösen (Roe *et al.* 1994). In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage, ob eine Freisetzung von Calcium aus IP<sub>3</sub> sensitiven Kompartimenten der Zelle an der Entstehung langsamer Oszillationen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> beteiligt sein könnte. Einzelne Untersuchungen weisen darauf hin, daß dies nicht der Fall ist (Liu *et al.* 1995).

Eine räumliche Analyse der Veränderungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in verschiedenen Regionen der Pankreasinsel der Maus zeigt, daß in allen Bereichen der Insel die glucoseinduzierten Oszillationen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> synchronisiert sind (Santos *et al.* 1991; Gilon & Henquin 1992). Die interzelluläre Kommunikation, die diesen hohen Grad an Synchronisation ermöglicht, wird wahrscheinlich durch eine Kopplung der einzelnen Beta-Zellen der Langerhansschen Insel über sogenannte Gap-Junctions bewirkt (Mears *et al.* 1995; Tornheim 1997; Andreu *et al.* 1997). Bei diesen Gap-Junctions handelt es sich um Kanäle in der Zellmembran, die einen Kontakt zu benachbarten Zellen aufbauen und auf diese Weise einen Austausch von Ionen und anderen Substanzen zwischen den Zellen ermöglichen. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, daß die Synchronisation von glucoseinduzierten Oszillationen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> auch in Clustern von mehreren Beta-Zellen über Gap-Junctions vermittelt wird (Hellman *et al.* 1992).

### **1.6.2 Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration in isolierten Beta-Zellen Langerhansscher Inseln**

Auch isolierte Beta-Zellen von Mäusen und Ratten zeigen nach Stimulation mit Glucose in Konzentrationen von 10-40 mM spontane, langsame Oszillationen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Diese unterscheiden sich jedoch in Frequenz und Form von denen, die in intakten Pankreasinseln beobachtet werden. Die Oszillationen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> beginnen nicht, wie bei intakten Pankreasinseln zu beobachten, von einem erhöhten, sondern von einem basalen Niveau (Hellman *et al.* 1992). Die Frequenz liegt bei 0,05-0,5 min<sup>-1</sup> (Hellman *et al.* 1992). Dabei wird der Calciumeinstrom in das Zytosol der Zelle mit dem schon geschilderten Mechanismus der Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen in der Zellmembran erklärt (siehe Punkt 1.2.1). Auch in diesen isolierten Pankreasinselnzellen liegen dem oszillatorischen



---

Verhalten der  $[Ca^{2+}]_i$  offenbar Oszillationen des Stoffwechsels zugrunde (*Hellman et al. 1992*).

## 1.7 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe eines dazu neu aufzubauenden mikrofluorimetrischen Meßplatzes mit der Möglichkeit zur photometrischen und bildgebenden Datenerfassung mögliche Ursachen für Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Langerhansschen Inseln und Einzelzellen des Pankreas der Maus zu ergründen. Dazu wurden verschiedene Substrate und Substanzen mit insulinsekretorischer Wirksamkeit eingesetzt.

Im einzelnen waren folgende Fragen zu klären:

1. Welchen Einfluß haben Glucose und Mannose auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  ?
2. Welchen Einfluß haben andere Substanzen mit insulinsekretorischer Wirkung auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  ?
  - a. andere glykolytische Metabolite (Glycerinaldehyd, Pyruvat, Methylpyruvat)
  - b. andere mitochondrial metabolisierte Stimulatoren der Insulinsekretion mit Nährstoffcharakter ( $\alpha$ -Ketoisocapronsäure)
  - c. blutzuckersenkende Sulfonylharnstoffe und analog wirkende Substanzen (Tolbutamid, N-Benzoyl-D-phenylalanin)
  - d. Substanzen, die über Second Messenger Systeme (z.B. Inositoltrisphosphat, cAMP) wirken (Adrenalin, 3-Isobuthyl-1-methylxanthin, Carbamylcholin)
3. Haben diese Substanzen auch einen Einfluß auf die durch Glucose induzierten Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  ?
4. Können diese Untersuchungen einen Anhaltspunkt für die Ursache dieser Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  liefern ?

## 2 Methoden und Materialien

### 2.1 Chemikalien und Medien

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

$\alpha$ -Ketoisocaprinsäure	SIGMA, München
[U- <sup>14</sup> C]D-Glucose	Hartmann, Braunschweig
3-Isobuthyl-1-methylxanthin (IBMX)	SIGMA, München
Adrenalin	SIGMA, München
Antazolin · HCl	SIGMA, München
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Carbamylcholin	SIGMA, München
D-Glucose	Merck, Darmstadt
D-Mannoheptulose	SIGMA, München
D-Mannose	SIGMA, München
DMSO	Merck, Darmstadt
EGTA	Baker, Deventer, Holland
Ethanol (96% v/v)	Baker, Deventer, Holland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	SIGMA, München
Fötales Kälberserum	GIBCO BRL, Eggenheim
Fura-2/AM	Molecular Probes, Eugene OR, USA
Fura-2-Kaliumsalz	Molecular Probes, Eugene OR, USA
Glycerinaldehyd	SIGMA, München
HEPES	SIGMA, München
Kollagen	SIGMA, München
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP)	Sigma/Aldrich Rare Chemicals
PBS-Pulvermedium	GIBCO BRL, Eggenheim
Penicillin	GIBCO BRL, Eggenheim
Rinderalbumin, Fraktion V (Pentex <sup>®</sup> )	Miles, Elkhart, II, USA
RPMI-Pulvermedium	GIBCO BRL, Eggenheim

Silikonfett	Beckmann
Streptomycin	GIBCO BRL, Eggenheim
Tolbutamid	Hoechst, Frankfurt a.M.
Trypsin	GIBCO BRL, Eggenheim

### 2.1.2 Medien

Alle für die Zellkultur verwendeten Lösungen wurden unter aseptischen Bedingungen mit autoklaviertem bidestilliertem Wasser angesetzt und anschließend steril filtriert (Sterilfilter, Porengröße < 0,2 µM, Schleicher & Schüll, Dassel). Um die Medien auf Sterilität zu überprüfen, wurden Proben in normalen Petrischalen, jedoch ohne Gewebe, parallel zu kultiviertem Gewebe im Brutschrank aufbewahrt.

#### 2.1.2.1 Zellkulturmedien

Als Medium für die Zellkultur wurde handelsübliches RPMI-1640 Medium verwendet.

RPMI 1640 Pulver Medium:			
Anorganische Salze:	mg/l	Andere Komponenten:	mg/l
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	100,00	D-Glucose*	2000,00
KCl	400,00	Glutathion (reduziert)	1,00
MgSO <sub>4</sub> (anhyd.)	48,84	Phenolrot	5,00
NaCl	6000,00		
Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub> (anhyd.)	800,00		
Aminosäuren:		Vitamine:	
L-Arginin · HCl	241,86	D-Biotin	0,20
L-Asparagin (freie Base)	50,00	D-Ca-Pantothenat	0,25
L-Asparaginsäure	20,00	Cholinchlorid	3,00
L-Cystein · 2HCl	65,15	Folsäure	1,00
L-Glutaminsäure	20,00	i-Inositol	35,00
L-Glutamin	300,00	Nikotinamid	1,00
Glycin	10,00	Para-Aminobenzoesäure	1,00
L-Histidin (freie Base)	15,00	Pyridoxal · HCl	1,00
L-Hydroxyprolin	20,00	Riboflavin	0,20
L-Isoleucin	50,00	Thiamin · HCl	1,00

L-Leucin	50,00	Vitamin B <sub>12</sub>	0,005
L-Lysin · HCl	40,00		
L-Methionin	15,00		
L-Phenylalanin	15,00		
L-Prolin	20,00		
L-Serin	30,00		
L-Threonin	20,00		
L-Tryptophan	5,00		
L-Tyrosin (Di-Na-Salz)	28,94		
L-Valin	20,00		

\* ohne Glucosezusatz für Glucosefreies Medium

Das konfektionierte Gemisch wurde in der jeweils angegebenen Menge Wasser gelöst und mit 4 g/l NaHCO<sub>3</sub> versetzt. Dann wurde der pH auf 7,2 eingestellt und das Medium steril filtriert.

Das Medium wurde vor der Verwendung mit FCS (Endkonzentration 10%) sowie Penicillin V (100 U/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) supplementiert. Die Lagerung der gebrauchsfertigen Kulturmedien erfolgte bei 4°C.

Das FCS wurde von GIBCO im tiefgefrorenen Zustand in Flaschen zu 500 ml bezogen. Vor dem Zusatz zum Medium wurde eine Flasche aufgetaut, die benötigte Menge entnommen und der Rest bis zur Verwendung in Portionen zu 50 ml in Polypropylenröhrchen eingefroren (-20°C).

Die Glucosekonzentration des erhältlichen RPMI-1640 Pulvermediums beträgt 0 mM oder 10 mM. Um die für die Kultivierung der Inseln und isolierten Einzelzellen benötigte Glucosekonzentration von 5 mM zu erreichen, wurden zwei gleiche Volumina beider Ausgangskonzentrationen gemischt.

### 2.1.2.2 Meßmedien

Als Meßmedium wurde HEPES (25 mM) gepuffertes Krebs-Ringer Medium verwendet. Alle als Stimulatoren verwendeten Substanzen wurden ohne osmotischen Ausgleich zugesetzt. Das Medium der Vorperfusion (Basalmedium) enthielt die während der Stimulation anwesende Glucosekonzentration, höchstens jedoch 5 mM als nichtstimulatorische Konzentration (*Hellman et al. 1992*).

Krebs Ringer (KR) HEPES Medium	
134 mM	NaCl
4,8 mM	KCl
1,0 mM	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
1,2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,2 mM	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
25 mM	HEPES

Die Lösung wurde bei 37°C mit 2 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

### 2.1.2.3 Fura-2/AM Inkubationsmedium

Krebs Ringer (KR) HEPES Medium	
134 mM	NaCl
4,8 mM	KCl
1,0 mM	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
1,2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,2 mM	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
25 mM	HEPES
3 % (w/v)	BSA
3 µM	Fura-2/AM

Die Inkubation der Inseln und Einzelzellen mit Fura-2/AM erfolgte in HEPES gepuffertem Krebs-Ringer Medium (siehe 2.1.2.2), das 5 mM Glucose sowie 3 % BSA enthielt (*Theiler et al. 1992*).

Um eine Fura-2/AM Konzentration von 3 µM zu erreichen, wurden pro ml Beladungsmedium 3 µl einer 1 mM Fura-2/AM Stammlösung (in DMSO) zugesetzt. Der Zusatz von 1 % DMSO hatte keinen Einfluß auf die Funktionalität des verwendeten Gewebes oder auf dessen Antwort auf Stimulation.

### 2.1.2.4 Fura-2/AM Stammlösung

Fura-2/AM wurde in Portionen zu 50 µg bezogen. Diese wurden jeweils unmittelbar vor Gebrauch in 50 µl DMSO aufgelöst (Endkonzentration 1 mM). Die Aufbewahrung des Esters in Lösung erfolgte unter Lichtausschluß bei -20°C.

### 2.1.2.5 Tolbutamid Stammlösung

Tolbutamid ist bei pH 7,4 nur schwer in Lösung zu bringen. Es wurde daher in 1 N NaOH gelöst, die Lösung mit 2 N HCl auf pH 7,4 zurücktitriert und mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Tolbutamid Stammlösung	
540 mg	Tolbutamid
60 ml	1 N NaOH
ca. 30 ml	2 N HCl
Bideest H <sub>2</sub> O ad 100 ml	

Für die Stimulation wurden pro ml Medium 10 bzw. 40 µl Stammlösung zugegeben (Endkonzentration 200 bzw. 800 µM).

Die Stammlösung wurde zu 10 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 2.1.2.6 Adrenalin Stammlösung

Adrenalin ist in neutraler wäßriger Lösung instabil und muß daher mit 0,01 N HCl stabilisiert werden.

Adrenalin Stammlösung	
0,92 mg	Adrenalin
5 ml	0,01 N HCl

Für die Versuche wurden pro ml Medium 1 µl Stammlösung zugegeben (Endkonzentration 100 nM). Die Stammlösung wurde bei 4°C unter Lichtausschluß gelagert.

### 2.1.2.7 NBDP Stammlösung

NBDP Stammlösung	
26,9 mg	NBDP
1 ml	DMSO

NBDP wurde als 20 mM Stammlösung in DMSO verwendet, die jeweils vor jedem Versuch frisch angesetzt wurde. Für die Stimulation wurden pro ml Medium 10 bzw. 40  $\mu$ l Stammlösung zugegeben (Endkonzentration 200 bzw. 800  $\mu$ M).

### 2.1.2.8 Collagen-Lösung

Das als Lyophilisat gelieferte Collagen wurde in 2 ml steriler 0,2 % Essigsäure pro mg Collagen gelöst. Die Lösung wurde in Portionen zu 200  $\mu$ l aliquotiert und im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Unter diesen Bedingungen ist die Lösung mehrere Monate haltbar. Zur Beschichtung von Deckgläsern wurden 1,8 ml dieser Lösung auf ein 15 mm  $\varnothing$  Deckgläsern pipettiert und gleichmäßig verteilt. Die beschichteten Deckgläsern waren nach 1 h in Trocknung in steriler Umgebung gebrauchsfertig. Die so präparierten Deckgläsern konnten bis zu einer Woche in steriler Umgebung gelagert werden.

## 2.2 Pankreasinseln und Zellkultur

### 2.2.1 Tiere

Alle Experimente wurden mit 6-10 Wochen alten, weiblichen NMRI-Mäusen (20-25 g) durchgeführt. Die Tiere wurden in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Makrolon Größe III) unter konstanten Haltungsbedingungen bei  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 70-80 % rel. Luftfeuchtigkeit und einem Lichtrhythmus von 06:00 bis 18:00 Uhr gehalten. Die Tiere erhielten eine pelletierte Alleindiät (Altromin 1310, Lage/Lippe) mit einem Kohlenhydratanteil von 50 %. Zusätzlich hatten die Tiere freien Zugang zu Leitungswasser über Tränkeflaschen.

### 2.2.2 Isolierung von Langerhansschen Inseln

Langerhanssche Inseln wurden aus den Pankreata von NMRI-Mäusen durch Collagenaseverdau des exokrinen Anteils isoliert. Hierzu wurden die Tiere nach



Ethernarkose durch Dekapitation getötet und nach Eröffnung des Bauchraumes das Pankreas herauspräpariert. Nach manueller Zerkleinerung in 2 ml Krebs-Ringer Bicarbonat/HEPES Puffer (KRBH) wurde Collagenase (0,5 mg/ml Collagenase P, Boehringer, Mannheim) hinzugefügt und für 13-14 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad bei einer Frequenz von 300 min<sup>-1</sup> inkubiert. Dann wurde der Collagenaseverdau mit kaltem KRBH Puffer abgestoppt. Das verdaute Gewebe wurde anschließend mit KRBH Puffer gewaschen. Unter dem Stereomikroskop (Zeiss, Oberkochen) wurden die Inseln manuell in 5 mM Glucose enthaltendes RPMI 1640 Medium überführt.

#### Krebs Ringer (KR) Stammlösung

10-fach konzentriert:

1,15 M	NaCl
47 mM	KCl
25,6 mM	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
12 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
12 mM	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O

#### 5 mM Glucose Krebs-Ringer

Bicarbonat/HEPES Medium:

10 mM	HEPES
20 mM	NaHCO <sub>3</sub>
5 mM	Glucose Monohydrat
10% (v/v)	10x KRB-Stammlösung
steriles bidest. Wasser ad 100 ml	

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Danach wurde 0,1% Albumin hinzugegeben und anschließend durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert. Die Lösung war im Kühlschrank bei 4°C eine Woche lang haltbar.

### 2.2.3 Präparation von Einzelzellen aus Langerhansschen Inseln

Die Desintegration von Langerhansschen Inseln zu Einzelzellen erfolgte mit Hilfe von  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem KR-Medium. Zusätzlich ist das Medium mit 0,1 % BSA sowie 3 mM Glucose (*Lernmark 1974*) supplementiert.

Krebs Ringer (KR) HEPES Medium	
$\text{Ca}^{2+}$ -frei	
135 mM	NaCl
4,8 mM	KCl
0,5 mM	EGTA
1,2 mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
1,2 mM	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
25 mM	HEPES
3 mM	Glucose
0,1 % (w/v)	BSA

Die Inseln werden wie oben beschrieben isoliert und einmal mit  $\text{Ca}^{2+}$  freiem Medium gewaschen. Danach wurden sie in eine 3,5 cm  $\varnothing$  Petrischale überführt, in der sich 2 ml  $\text{Ca}^{2+}$  freies Medium befanden. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Inseln mitsamt der Lösung in ein steriles 14 ml Zentrifugenröhrchen überführt und weitere 1-2 min mit dem Vortex geschüttelt. Es wurde solange geschüttelt, bis keine Inseln oder Inselnfragmente mehr mit dem bloßen Auge erkennbar waren. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min bei 1000 g), das  $\text{Ca}^{2+}$  freie Medium abgezogen und mit 300  $\mu\text{l}$  10 mM glucosehaltigem RPMI Medium resuspendiert. Jeweils 20  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden auf 15 mm  $\varnothing$  Deckgläschen pipettiert, so daß sich ein stehender Tropfen bildete. Die so vorbereiteten Zellen wurden 2 h im Brutschrank inkubiert.

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Kultivierung von Langerhansschen Inseln

Die isolierten Inseln wurden einzeln auf collagenbeschichteten (siehe 2.1.2.8) Deckgläschen (Stärke 1,  $\varnothing$  15 mm, Menzel, Braunschweig) ausgesetzt, und diese paarweise in 3,5 cm  $\varnothing$

Gewebekulturschalen (Greiner), die 3 ml RPMI 1640 Medium mit 5 mM Glucosezusatz enthielten, in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau) kultiviert. Die so vorbereiteten Inseln waren nach 48 h fest angewachsen und meßbereit. Die Kulturdauer betrug bis zu 7 Tage, ohne daß ein Verlust an Funktionalität erkennbar war.

### **2.3.2 Kultivierung von Einzelzellen aus Langerhansschen Inseln**

Von der Zellsuspension wurden jeweils 25 µl auf trockene, mit Ethanol (96% v/v) gewaschene Deckgläschen pipettiert, so daß sich ein stehender Tropfen bildete. Die Deckgläschen befanden sich paarweise in 35 mm durchmessenden Petrischalen. Nach 2 h Inkubation im Brutschrank, wurden vorsichtig 3 ml 5 mM glucosehaltiges RPMI 1640 Medium zugegeben. Die so kultivierten Zellen waren nach 24 h Meßbereit. Die Kulturdauer betrug bis zu 4 Tage, ohne daß ein Verlust an Funktionalität erkennbar war.

## **2.4 Mikroskop**

Für die Messungen stand ein inverses Mikroskop Axiovert 135 TV (Zeiss, Oberkochen) zur Verfügung. Es war mit jeweils einem 10x, 40x und 100x FLUAR Ölimmersionsobjektiv (Zeiss, Oberkochen) ausgestattet, deren Quarzlinsen die Verwendung von UV-Licht für die Epifluoreszenz möglich machte. Hinzu kam ein Reflektorschieber (Zeiss, Oberkochen) für insgesamt drei dichroitische Strahlteiler (TILL Photonics, Planegg), so daß ohne großen Aufwand ein für die jeweilige Meßaufgabe erforderliches Spiegel-Filter-System verwendet werden konnte. Über verschiedene bewegliche Spiegel im Inneren des Mikroskops konnte das Licht, welches vom Objekt kam, auf unterschiedliche Detektoren geleitet werden: eine CCD-Kamera, eine Photokamera, einen Photomultiplier oder durch die Okulare zum Auge.

### **2.4.1 Temperierbares Objektiv**

Da das Objektiv über das Immersionsöl (Zeiss, Oberkochen) mit der Meßkammer in Kontakt stand, könnte es an dieser Stelle zu einer Wärmeabfuhr und somit zu Temperaturschwankungen kommen. Um diese zu vermeiden, wurde das Objektiv mit Hilfe einer stromdurchflossenen Widerstandsfolie (Minco, Telemeter, Donauwörth; Netzteil TNG-35, Conrad Elektronik, Hirschau) auf 37°C temperiert.

### 2.4.2 Lichtleitereinkoppelung

Die Einkoppelung des vom Monochromator (TILL-Photonics, Planegg) kommenden Quarzlichtleiters (TILL-Photonics, Planegg) erfolgte an der Rückseite des Mikroskops. Über ein Linsensystem, daß auf einer optischen Bank (TILL-Photonics, Planegg) montiert war, wurde der monochromatische Lichtstrahl über den dichroitischen Strahlteiler und das Objektiv auf das Objekt abgebildet.

### 2.4.3 Dichroitischer Strahlteiler

Der dichroitische Strahlteiler für die Fura-2 Fluoreszenz bestand aus einem dichroitischen Spiegel (TILL Photonics, Planegg), neutralen Graufiltern (50 % und 90 % Laser Optics, Gröbenzell) sowie einem Blockfilter (TILL Photonics, Planegg). Der dichroitische Spiegel reflektierte kurzwelliges Licht (Anregungslicht der Fluoreszenz) und transmittierte langwelliges Licht (Emissionslicht der Fluoreszenz). Er war in einem Winkel von 45° unterhalb des Mikroskopobjektivs in einem Reflektorschieber montiert, so daß das eingekoppelte Licht vom Monochromator zum Objektiv reflektiert wurde. Durch neutrale Graufilter (Laser Optics, Gröbenzell) vor dem dichroitischen Spiegel, die im Reflektorschieber oder auf der optischen Bank montiert waren (Halterung für optische Bank: Spindler & Hoyer, Göttingen), konnte die Intensität des monochromatischen Lichts um 50%, 90% oder 95% reduziert werden. Dies ist erforderlich, da die volle Intensität des UV-Lichts (340 nm bzw. 380 nm) schädigenden Einfluß auf die Funktionalität der Zellen ausübt (*Grapengiesser 1993*).

### 2.4.4 View-Finder

Zwischen dem Okulartubus des Mikroskops und dem Photomultiplier war ein View-Finder (TILL-Photonics, Planegg) montiert. Dieser ermöglicht die Ausblendung eines Teils des Sichtfeldes des PMT (siehe 2.6.7). Dies wird durch vier, paarweise parallel angeordnete, unabhängig voneinander bewegliche Bleche bewirkt. In den View-Finder ist eine CCD-Kamera eingebaut, die es ermöglicht, die Größe und die Position des Fensters sowie das beobachtete Objekts auf einem Monitor darzustellen.

## 2.5 Temperierung und Umströmungsapparatur

Zur Temperierung von Objektträger und Zuläufen, wurde die Verlustwärme von Leistungstransistoren bei der Stromverstärkung genutzt. Um eine Temperaturregelung zu erzielen, werden in einem Differenzverstärker zwei Spannungen verglichen. Dabei handelt es sich um eine einstellbare Referenzspannung  $U_{\text{Ref}}$ , die von einer Spannungsquelle geliefert wird, und eine Regelspannung  $U_{\text{Temp}}$ , die ein PT-100 Temperaturfühler (Telemeter, Donauwörth) lieferte. Bei  $U_{\text{Ref}} > U_{\text{Temp}}$  wird vom Differenzverstärker die Spannung  $U_{\text{Reg}}$  an der Basis von zwei Leistungstransistoren erhöht. Auf diese Weise wird zwischen Emitter (E) und Collector (C) eine höhere Stromverstärkung bewirkt, die eine stärkere Erzeugung von Verlustwärme bedingt. Sind beide Spannungen gleich, wird die Basisspannung verringert, so daß sich der Stromfluß zwischen E und C verringert und somit weniger Abwärme erzeugt wird. Die vom PT-100 gelieferte Spannung beträgt  $200 \text{ mV}/^\circ\text{C}$ . Diese Spannung wird zusätzlich zur Anzeige der aktuellen Temperatur auf einem Display an der Frontplatte des Gehäuses genutzt. Außerdem ist sie über eine BNC-Buchse an der Rückseite des Gehäuses abgreifbar und kann extern z.B. auf einem Schreiber aufgezeichnet werden. Die Temperatursteuerung war zweikanalig ausgelegt, wobei jeder Kanal unabhängig vom anderen auf die gewünschte Solltemperatur eingestellt werden konnte.

### 2.5.1 Meßkammer

Die Meßkammer besteht aus zwei ringförmigen Körpern aus Polycarbonat, die miteinander verschraubt werden können. Ein in den unteren Teil eingelegtes Deckgläschen ( $\varnothing 15 \text{ mm}$ , Stärke 1) bildet den Boden. Die Kammer hat ein maximales Volumen von  $1000 \mu\text{l}$  und ein minimales Volumen von  $200 \mu\text{l}$ . Sie ist so bemessen, daß sie bündig in den temperierbaren Objektträger eingesetzt werden kann. Um Undichtigkeiten zwischen Kammerwänden und Deckgläschen zu vermeiden, wird dieses vom oberen Teil her mit Silikonfett abgedichtet. Versuche hatten ergeben, daß das Fett keinen Einfluß auf die Funktionalität von Inseln oder Einzelzellen hatte.

### 2.5.2 Temperierung des Objektträgers

Um eine gleichmäßige Temperierung der Meßkammer zu gewährleisten, wurde ein beheizbarer Objektträger entwickelt und aufgebaut. Der Objektträger besteht aus

Aluminium und verfügt über eine zentrale Bohrung zur Aufnahme der Meßkammer. Diese wird mit Hilfe eines verschraubbaren Bügels fixiert. Diese Fixierung verhindert, daß die Meßkammer durch das Ölimmersionsobjektiv des inversen Mikroskops, nach oben aus dem Objektträger gedrückt werden kann. Die Beheizung erfolgt durch die in Kapitel 2.5 beschriebene Verlustwärme von Leistungstransistoren. Die Temperaturmessung erfolgt direkt am Objektträger in unmittelbarer Nähe der Meßkammer und nicht in ihr. Diese Anordnung des Temperaturfühlers hat den Vorteil, daß es nicht zu einer „Überregelung“ kommen kann, die durch die Trägheit der Wärmeüberleitung vom Objektträger zum Kammerinneren ausgelöst würde. Dabei wird bei einem Abfall der Temperatur in der Meßkammer die Temperatur des Objektträgers zu stark nachgeregelt, so daß die Temperatur in der Meßkammer „überschwingen“ würde. Die Temperatur des Objektträgers wurde auf  $38^{\circ}\text{C} (\pm 0,1^{\circ}\text{C})$  eingestellt, was bei durchströmter Meßkammer eine Innentemperatur von  $37^{\circ}\text{C} (\pm 0,1^{\circ}\text{C})$  ergab.

### **2.5.3 Temperierung der Zuflüsse**

Um Temperaturschwankungen in der Meßkammer durch zuströmendes Meßmedium zu verhindern, wurden temperierbare Zuflüsse konstruiert. Dabei handelt es sich um beheizte Aluminiumblöcke, durch die mit Medium durchströmte Kanülen geschoben werden (*Vierling & Stampfl 1994*). Temperierung und Temperaturregelung erfolgen auf die in Kapitel 2.5 beschriebene Weise. Um Medium von Raumtemperatur auf  $37^{\circ}\text{C}$  zu erhitzen wurde die Temperatur der Zuflüsse bei einer Strömungsgeschwindigkeit von  $1 \text{ ml min}^{-1}$  auf  $45^{\circ}\text{C} (\pm 0,2^{\circ}\text{C})$  eingestellt.

### **2.5.4 Pump- und Ventilsystem**

Zum Pumpen der Meßmedien von den Reservoirs zur Meßkammer sowie zum Abpumpen aus der Meßkammer zum Abfallbehälter wurde eine 4-Kanal Peristaltik Pumpe (Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) mit konstanter Umdrehungszahl verwendet. Um das Pulsen der Pumpe durch die peristaltische Pumpbewegung zu minimieren, wurde ein Modell mit acht Rollen gewählt (Typ MS-CA4 820). Um die gewünschte Flußrate von  $1 \text{ ml min}^{-1}$  für die Zuläufe zu erreichen, wurde ein Pumpenschlauch mit einem Innendurchmesser von  $0,89 \text{ mm}$  verwendet (Farbmarkierung orange/weiß; Ismatec). Zum Abpumpen wurde ein

Schlauch mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm (Farbcode grün; Ismatec) gewählt. Die durch den größeren Durchmesser im Vergleich zu den Zulaufpumpschläuchen bedingte größere Flußrate des Ablaufs verhinderte, daß der Flüssigkeitspegel in der Meßkammer über das gewünschte Niveau anstieg.

Zum Wechsel des in die Meßkammer strömenden Mediums wurden 3-Wege-Ventile (Lee, Westbrook CO, USA) verwendet. Um einen, durch das beständige Pumpen bedingten Druckaufbau vor den geschlossenen Ventilen zu vermeiden, wurde das gerade nicht benötigte Medium in das jeweilige Reservoir zurückgepumpt. Für den Medienwechsel standen drei Ventile zur Verfügung (Basalmedium sowie zwei Meßmedien). Die von den Ventilen zur Meßkammer führenden Schläuche mündeten in einen Verteiler (Eigenbau). Aus dem Verteiler wurden die Medien durch eine Kanüle in die Meßkammer geleitet. Die durch Verteiler und Kanüle gebildete Strecke bedingte eine Totzeit von 4 s beim Medienwechsel. Diese Totzeit wurde bei allen Abbildungen graphisch korrigiert.

### 2.5.5 Positionierung der Zuflüsse in der Meßkammer

Die Positionierung der temperierten Zuflüsse in der Meßkammer erfolgte über XZ-Manipulatoren, die direkt am Kreuztischadapter (Zeiss, Oberkochen) des Mikroskops befestigt waren. Sie erlaubten die Bewegung der Zuflüsse auf und ab bzw. vor und zurück. Die Feinpositionierung erfolgte mit Hilfe von Kugelgelenken, die an den Manipulatoren befestigt waren.

## 2.6 Ca<sup>2+</sup> Analytik

Die klassischen Methoden der Ca<sup>2+</sup>-Analytik sind die Messung der <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme, des <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Effluxes, die Atomabsorptionsspektroskopie, Chemolumineszenz mit dem Photoprotein Aequorin und die Verwendung Ca<sup>2+</sup>-sensitiver Mikroelektroden (*Ashley & Campbell 1978*). Die nichtinvasive Bestimmung der freien intrazellulären Calciumkonzentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) stellt an ein analytisches System besondere Anforderungen. Diese Anforderungen können nur von Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen erfüllt werden. Da die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> im submikromolaren Bereich liegt (typischerweise 10<sup>-7</sup> M basal) und zudem eine mehr als 1000-fach höhere Mg<sup>2+</sup> Konzentration vorliegt, muß der betreffende Farbstoff eine niedrige K<sub>D</sub> für Calcium besitzen und gut zwischen Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen diskriminieren können (*Übersicht bei Cobbold & Rink 1987*).

### 2.6.1 Ca<sup>2+</sup> sensitive Fluoreszenzindikatoren

Erste fluorimetrische Messungen der freien cytosolischen Calciumkonzentration wurden von Tsien und Mitarbeitern mit dem Fluoreszenzindikator Quin-2 durchgeführt (Tsien 1982). Quin-2 komplexiert Ca<sup>2+</sup>-Ionen und ändert dabei konzentrationsabhängig die Intensität der Fluoreszenz. Die Substanz weist jedoch einige Nachteile auf, unter anderem eine niedrige Anregungswellenlänge (339 nm), eine geringe Quantenausbeute sowie eine schlechte Diskriminierung zwischen Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen. Tabelle 1 faßt die Anforderungen an einen Fluoreszenzindikator für intrazelluläre Ionenmessungen zusammen.

Anforderung	Nutzen
Anregungswellenlänge im langwelligen Spektrum	Geringe Eigenfluoreszenz der Zellen, keine Schädigung der Zellen durch UV-Licht, Einsatz von teuren Quarz-Optiken (Lichtleiter, Objektive) überflüssig
Hohe Quantenausbeute	Starkes Signal bei geringer Indikatorkonzentration, dadurch keine Beeinträchtigung der [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> durch Puffern, gutes Signal-Rausch-Verhältnis
Verschiebung der Anregungs- oder Emissionswellenlänge bei Ca <sup>2+</sup> -Komplexierung	Unabhängigkeit von der intrazellulären Indikatorkonzentration und konstanten Geräteparametern bei der Kalibrierung des Signals durch Bildung eines Quotienten der Fluoreszenzintensität bei unterschiedlichen Anregungs- oder Emissionswellenlängen
Gute Diskriminierung zwischen Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Keine Verfälschung der Meßergebnisse durch Magnesiumionen

*Tabelle 1: Anforderungen an einen Fluoreszenzfarbstoff*

Die Nachteile bei der Verwendung des älteren Fluoreszenzindikators Quin-2 haben in der Folge zur Entwicklung einer ganzen Reihe weiterer Ca<sup>2+</sup>-sensitiver Fluoreszenzindikatoren geführt, die bis heute nicht abgeschlossen ist. Die folgende Tabelle führt einige Beispiele für Fluoreszenzindikatoren auf.



Ca <sup>2+</sup> Indikator	Messung bei	K <sub>D</sub> [nM] §	intrazelluläre Kompartimentierung
Quin-2	Emission 495 nm	60	Zytosol
Fura-2	Anregung 340/380 nm	145	Zytosol
Indo-2	Emission 405/485 nm	230	Zytosol
Fluo-3	Emission 525 nm	390	Mitochondrien
Calcium Crimson	Emission 615 nm	185	Zytosol

§ Die K<sub>D</sub> wurde unter folgenden Bedingungen bestimmt : 100 mM KCl, 10 mM MOPS, pH 7,2, T=22°C (*Molecular Probes 1994*)

*Tabelle 2: Anforderungen an einen Fluoreszenzfarbstoff*

### 2.6.2 Der Ca<sup>2+</sup>-Indikator Fura-2

Die beschriebenen Nachteile des Fluorophors Quin-2 führten zur Entwicklung von Fura-2 durch Grynkiewicz et al. (1985) als erstem Vertreter einer neuen Generation von Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen. Fura-2 zeigt eine Verschiebung des Emissionsmaximums bei der Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen, eine bessere Quantenausbeute als Quin-2 sowie eine höhere Calciumselektivität. Die Verschiebung des Anregungsmaximums bei der Ca<sup>2+</sup>-Bindung ermöglicht es, die Emission bei 520 nm bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen zu messen (z.B. bei 340 und 380 nm).

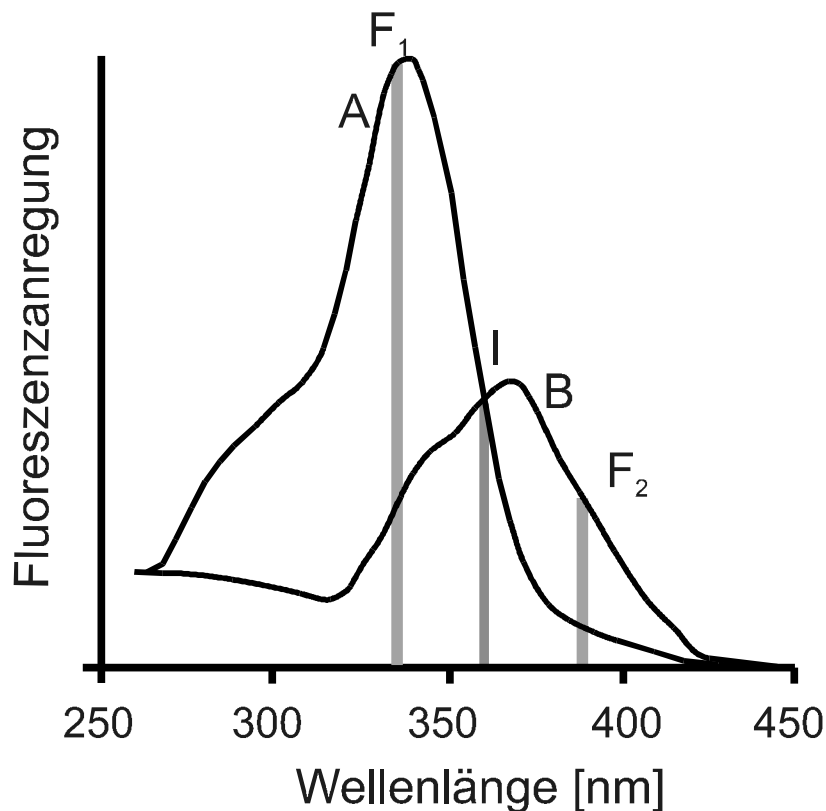


Abb 5 : Anregungsspektrum von Fura-2 bei Calciumsättigung und in Abwesenheit von Calcium.

A: Anregungsspektrum bei Calciumsättigung, B: Anregungsspektrum bei Abwesenheit von Calcium. F<sub>1</sub>: Anregungswellenlänge 340 nm, F<sub>2</sub> Anregungswellenlänge 380 nm, I: Isosbestischer Punkt (363 nm)

Der Quotient aus den beiden Fluoreszenzintensitäten ist unabhängig von der Fura-2-Konzentration und ist bei konstanten Geräteparametern eine Funktion der freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Nach einer Kalibrierung unter kontrollierten Bedingungen kann man diese daher berechnen (siehe Kap. 2.6.5).

Fura-2 ist eine fünfwertige Carbonsäure, die auf dem Ca<sup>2+</sup>-Chelator BAPTA (1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tertraacetat) basiert. Als freie Säure sowie als Ca-Komplex kann der Farbstoff die Zellmembran nicht durchdringen, ist daher nur für Mikroinjektionsexperimente geeignet. Um diese invasive Form der Farbstoffbeladung zu vermeiden, steht Fura-2 (wie zuvor auch Quin-2, (Tsién 1981) als Acetoxymethylester (Fura-2/AM) zur Verfügung.

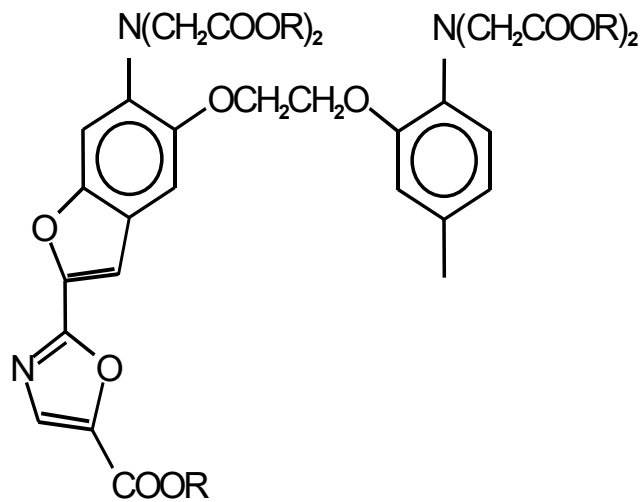


Abb 6: Strukturformel von Fura-2

R = H : Fura-2, R = CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub> : Fura-2/AM

Dieser Ester kann aufgrund seiner, gegenüber der freien Säure, erhöhten Lipophilie durch die Zellmembran diffundieren und gelangt so in das Zytosol der Zielzelle. Dort angelangt, wird der Ester durch unspezifische Esterasen gespalten und in die membranimpermeable freie Säure überführt. Auf diese Weise können trotz geringer extrazellulärer Konzentrationen von 1-5  $\mu$ M im Zellinneren Konzentrationen von bis zu 100  $\mu$ M erreicht werden. Als Nachteil des AM-Esters ist zu werten, daß auch er selbst wie die unkomplexierte freie Säure bei 380 nm fluoresziert. Dies kann bei unzureichender Hydrolyse des Esters zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen, die sich in der Berechnung von zu geringen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen äußert.

### 2.6.3 Inkubation mit dem Fluorophor FURA-2

Die Deckgläser mit den anhaftenden Inseln bzw. Einzelzellen wurden für 45 min (Inseln) bzw. 30 min (Zellen) mit FURA-2/AM-haltigem Inkubationsmedium inkubiert.

### 2.6.4 Durchführung der Ca<sup>2+</sup> Messung

Die Deckgläser mit den anhaftenden und mit Fluorophor inkubierten Inseln bzw. Zellen wurden an der Unterseite mit einem fusselfreien Zellstofftuch (Kimwipes, Kimberley-Clark, Northop, UK) trocken gewischt und in die Meßkammer überführt. Dann wurden vorsichtig 200  $\mu$ l Basalmedium in die Kammer gefüllt und diese sodann im Objektträger

befestigt. Nach Fokussierung des gewünschten Objekts wurden Zu- bzw. Ablauf so innerhalb der Kammer positioniert, daß sich der Zulauf in unmittelbarer Nähe des Objekts und der Abfluß am oberen Rand des Flüssigkeitsspiegels befand. Die Meßsequenz wurde nach dem Einschalten der peristaltischen Pumpe gestartet.

### 2.6.5 Ca<sup>2+</sup> Kalibrierung

Die Gleichung nach Grynkiewicz et al. (1985) für die Umrechnung der gemessenen Ratios in Calciumkonzentrationen lautet wie folgt :

$$[Ca^{2+}]_i = \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \cdot \beta \cdot K_D$$

mit  $R_{\min}$  als gemessenem Ratio in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium,  $R_{\max}$  als gemessenem Ratio bei Ca<sup>2+</sup>-Sättigung, R als gemessenem Ratio im Experiment,  $K_D$  als Dissoziationskonstante von Fura-2 und  $\beta$  als dem Quotienten der Fluoreszenzintensitäten von Ca<sup>2+</sup>-freiem bzw. Ca<sup>2+</sup>-gesättigtem Fura-2 bei 380 nm (zur Herleitung der Gleichung siehe Grynkiewicz et al. (1985)). Es wurden folgende Konstanten verwendet :  $R_{\min} = 0,34$  ;  $R_{\max} = 8,27$  ;  $\beta = 5,48$  ;  $K_D = 176$  nM (Diederichs 1997). Die Konstanten, insbesondere die der  $K_D$  gelten bei 37°C bei einer Ionenstärke von  $I = 180$  mM.

### 2.6.6 Monochromator

Der zur Verfügung stehende Monochromator (TILL Photonics, Planegg) kann Wellenlängen im Bereich von 260-620 nm in 1 nm Schritten erzeugen. Er verwendet eine Xe-Hochdruck-Lichtbogenlampe als Lichtquelle, deren Spektrum so beschnitten war, daß unterhalb von 300 nm keine UV-Strahlung mehr emittiert wurde. Die Diskriminierung der Wellenlänge erfolgt über ein drehbar aufgehängtes holographisches Gitter, von dem aus das monochromatische Licht über einen Spiegel in einen Quarzlichtleiter eingekoppelt wurde. Der Monochromator wurde sowohl für das photometrische als auch für das Imaging System verwendet.

### 2.6.7 Photometrisches Meßsystem

Das photometrische Meßsystem bestand aus einem Photomultiplier (SMT, Seebach) mit vorgeseztem View-Finder (Till Photonics, Planegg) zur Wandelung der

Fluoreszenzlichtintensität in eine elektrische Spannung. Die erzeugte Spannung wird vom Analog-Digital(A/D)-Wandler-Teil eines ITC-16 AD/DA-Wandlers (Instrutec, Greatneck, NY, USA) digitalisiert und über ein Interface Board (Instrutec, Greatneck, NY, USA) zu einem Personal Computer geleitet, wo sie vom Programm PULSE (Version 8.07, HEKA Elektronik, Lambrecht) registriert und ausgewertet wird. Die Ansteuerung des Monochromators erfolgt ebenfalls vom Programm PULSE aus, das über den Digital-Analog (D/A)-Wandler-Teil des ITC-16 direkt die Monochromatorsteuerung ansteuert. Die Synchronisierung von Monochromatoransteuerung und Datenaufnahme wird durch die Software gesteuert. Die Empfindlichkeit des Photomultipliers kann stufenlos am Monochromatorsteuergerät durch Variation der Spannung des Sekundärelektronenverstärkers eingestellt werden. In Verbindung mit dem verwendeten Personal Computer (Prozessor i486DX-2/66, Betriebssystem Windows NT 4.0, Build 1831/SP2) kann eine Meßfrequenz von maximal drei Ratios pro Sekunde erreicht werden.

### **2.6.8 Imaging Meßsystem**

Das Imaging Meßsystem bestand aus einer Slow Scan CCD Kamera (Theta Electronic, Gröbenzell) mit Steuerung und dem schon beschriebenen Monochromatorsystem. Der Kamerachip verfügt über eine Auflösung von 387 x 284 Bildpunkten (Pixel) bei einer Graustufentiefe von 12 Bit (4096 Graustufen in der Einheit Counts [cts]). Durch die Software FUCAL (Version 5.12B, Till Photonics, Planegg) kann die Belichtungszeit der Kamera für bis zu sechs verschiedene Anregungswellenlängen, jeweils im Bereich von 10 bis 990 ms, in 1 ms Schritten variiert werden. Über eine im Computer montierte Timerplatine werden Monochromatoransteuerung und Bildaufnahme von der Software synchronisiert. Die Daten der einzelnen Pixel werden über eine Framegrabberkarte (Till Photonics, Planegg) in einen Personal Computer eingelesen, als Graustufenbilder auf dem Bildschirm dargestellt und können bei Bedarf on-line ausgewertet werden. Die Bilder werden auf der Festplatte des PC gespeichert werden, um sie später detailliert auszuwerten oder sie für Dokumentationen in ein anderes Graphikformat zu exportieren.

Um das thermische Rauschen des Kamerachips zu reduzieren, ist dieser mit einem Peltier-Element zur Kühlung ausgestattet. Dieses erreicht eine Temperaturdifferenz von maximal 20 K. Durch Kühlung der warmen Seite des Peltier-Elements mit kaltem Wasser (4°C) aus einem Kryostaten (Braun, Melsungen) kann das thermische Rauschen bei einer Temperatur

von  $-5^{\circ}\text{C}$  auf 3-5 cts reduziert werden. Eine weitere Reduzierung des Hintergrundes ermöglichte die Aufnahme eines Dunkelbildes, das in einem abgedeckten Teil des Kameraschips generiert wird und via Software vom gespeicherten Bild subtrahiert wird.

## 2.7 Datenaufnahme und -verarbeitung

### 2.7.1 Photometrisches System

Die Meßfrequenz mit dem photometrischen System betrug ein Ratio pro Sekunde. Dabei betrug die eigentliche Meßzeit 35 ms, die sich, wie in folgendem Schema dargestellt, aufteilte.

Zeit	5 ms	10 ms	10 ms	5 ms	5 ms
Wellenlänge	260 nm	340 nm	380 nm	363 nm	260 nm

Die Datenbereiche 340 und 380 nm wurden im 100  $\mu\text{s}$  Abständen gemittelt und der resultierende Mittelwert für die Ratioberechnung herangezogen. Um die Anstiegs- und Abfallzeiten zwischen den Plateaus zu eliminieren, wurde jeweils eine "Dead Time" von 5 ms abgezogen. Die Wellenlänge 363 nm diente als Referenzsignal, da Fura-2 bei dieser Wellenlänge seinen „isosbestischen“ Punkt besitzt (siehe Abb 5), das heißt, daß das Signal von der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration unabhängig und nur der Farbstoffkonzentration proportional ist. Um das zu untersuchende Gewebe zwischen zwei Meßzyklen nicht einer ständigen Bestrahlung mit UV-Licht auszusetzen, verharrte das Monochromatorgitter für diesen Zeitraum in der Position für 260 nm.

### 2.7.2 Imaging System

Mit dem Imaging System wurde alle drei Sekunden eine Ratio aufgenommen. Die effektive Meßzeit betrug 150 ms, jeweils 75 ms für die Aufnahme des Bildes bei 340 nm bzw. 380 nm Anregungswellenlänge. Die restliche Zeit zwischen den Meßzyklen, die für die on-line Auswertung sowie für die Speicherung der Bilder auf der Festplatte benötigt wurde, verharrte das Gitter in der Position für 260 nm.

Für die on-line Analyse der Daten bestand die Möglichkeit, bis zu drei rechteckige "Regions of Interest" (ROI) pro Bild festzulegen. Dabei wurden die Helligkeitswerte der

durch die ROI umschlossenen Pixel gemittelt und als Zahl im Bild dargestellt. Die so gewonnenen Werte (Einheit counts) wurden für die Ratioberechnung herangezogen. Um Veränderungen der Intensitäten besser beurteilen zu können, ermöglichte die Software eine Darstellung in Falschfarben. Dabei wurden den einzelnen Grauwerten bestimmte Farben zugeordnet, so daß sich Helligkeitsänderungen als Farbänderungen darstellten.

### 2.7.3 Validität des Meßsystems

Um die Validität des Meßsystems zu verifizieren, wurden die Ergebnisse einer ausgewählten Versuchsanordnung dieser Arbeit mit bereits in der Literatur (*Hellman et al. 1992*) beschriebenen Ergebnissen verglichen. Als Versuchsanordnung wurde die Stimulation mit 10 mM Glucose gewählt, da diese Glucosekonzentration die Standardkonzentration für Untersuchungen der freien intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln in der Literatur ist. *Hellman et al. (1992)* beschreibt vier verschiedene mögliche Typen von Antworten der  $[Ca^{2+}]_i$  von Pankreasinseln, die dem initialen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  folgen:

- (A) keine Oszillationen,
- (B) regelmäßige langsame Oszillationen (Frequenz 0,3-0,9/min),
- (C) regelmäßige schnelle Oszillationen (Frequenz 2-7/min),
- (D) irreguläre Oszillationen ohne erkennbares Muster.

Diese verteilen sich Prozentual wie folgt (n=44) (*Hellman et al. 1992*):

Typ	Anteil
A	23%
B	27%
C	27%
D	23%

Mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Meßsystem konnten die verschiedenen Typen der Antwort der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Stimulation mit 10 mM Glucose gut reproduziert werden. Dabei ergab sich folgende Verteilung (n=24):

Typ	Anteil
A	22%
B	44%
C	13%
D	13%

Diese Verteilung entspricht im wesentlichen der von Hellman et al. (1992) beschriebenen Verteilung mit einer etwas reduzierten Häufigkeit schneller (Typ C) und irregulärer (Typ D) Oszillationen und einer größeren Häufigkeit regulärer langsame Oszillationen. Dazu ist anzumerken, daß der Meßzeitraum der von Hellman et al. (1992) ausgewerteten Versuche lediglich ca. 20 min umfaßt. In der experimentellen Praxis dieser Arbeit zeigte sich jedoch, daß es häufig zu Übergängen zwischen den verschiedenen Oszillationstypen während des Experiments kam. Besonders häufig waren dabei Übergänge von Typ A (keine Oszillationen) zu Typ B (langsame Oszillationen) zu beobachten. In seltenen Fällen kam es auch zum Übergang von Typ B in Typ D (irreguläre Oszillationen). In der Regel wurden diese Übergänge ca. 25 bis 30 min nach dem Medienwechsel von 5 mM auf 10 mM Glucose beobachtet.



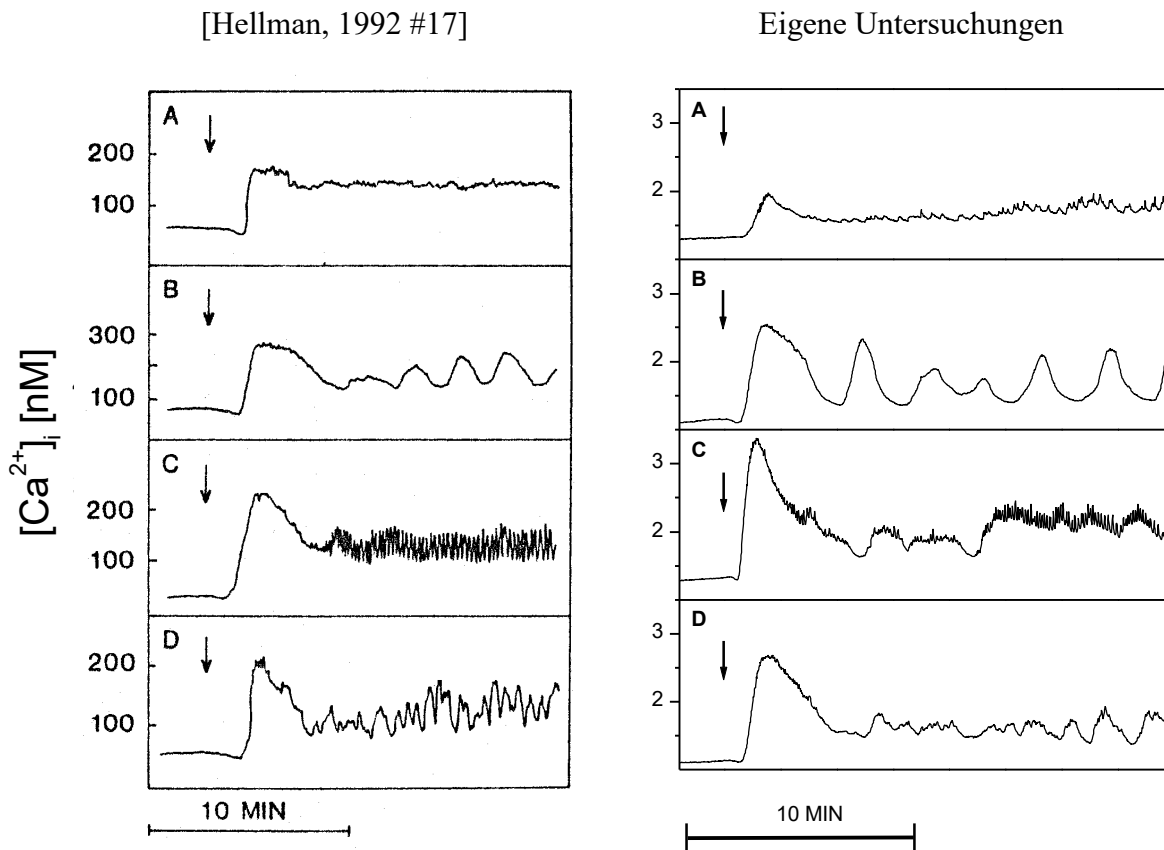


Abb. 7: Vergleich der verschiedenen Typen von Antworten der intrazellulären freien Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in Pankreasinseln der Maus wie in der Literatur beschrieben (Hellman 1992) und wie in den vorliegenden eigenen Untersuchungen beobachtet.

Der Pfeil markiert jeweils den Wechsel vom Basalmedium (3 mM Glucose (Hellman et al. 1992), bzw. 5 mM Glucose (vorliegende Arbeit) zu Testmedium mit 10 mM Glucose).

#### 2.7.4 Datenvisualisierung und Auswertung

Die Datenvisualisierung erfolgte mit Hilfe der Software "ORIGIN" (Version 4.1/32Bit/SR2, Microcal, Northampton MA, USA) und „PRISM“ (Version 2.01, GraphPad Software, San Diego CA, USA). Zur Berechnung der Oszillationsfrequenz wurden die Anzahl der vollständigen Transienten pro Zeit ermittelt. Zur Berechnung der Änderung der mittleren freien Calciumkonzentration wurde die Fläche unter der Kurve bestimmt und dieser Wert durch die Stimulationszeit geteilt. Zur Integration wurde die in ORIGIN implementierte Funktion verwendet. Es wurden die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (S.E.M.) aus der jeweils angegebenen Anzahl von unabhängigen Versuchen (n) berechnet. Die Berechnung erfolgte mit den jeweils implementierten Funktionen für die

---

Mittelwertbestimmung der Programme ORIGIN sowie EXCEL (Version 7.0, Microsoft, Unterschleißheim).

## **2.8 Glucoseoxidation**

Es wurde die Oxidation von [U-<sup>14</sup>C]D-Glucose alleine sowie unter dem Einfluß verschiedener Testsubstanzen bestimmt. Dabei wurde die Methodik und Versuchsanordnung, wie von Lenzen und Panten (1980) beschrieben, verwendet.

### **3 Resultate**

#### **3.1 Einfluß von Stoffwechselfsubstraten auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln der Maus**

##### **3.1.1 Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen (10-40 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von Glucose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln nach einer Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 10-40 mM. Glucose induzierte zunächst einen kurzzeitigen, leichten Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ , dem ein transientser Anstieg folgte. Diesem schlossen sich spontane Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  mit langsamer Frequenz an. Abb. 8 bis Abb. 10 zeigen die Antworten der  $[Ca^{2+}]_i$  bei einer Stimulation mit 10, 15, 20, 30 und 40 mM Glucose.

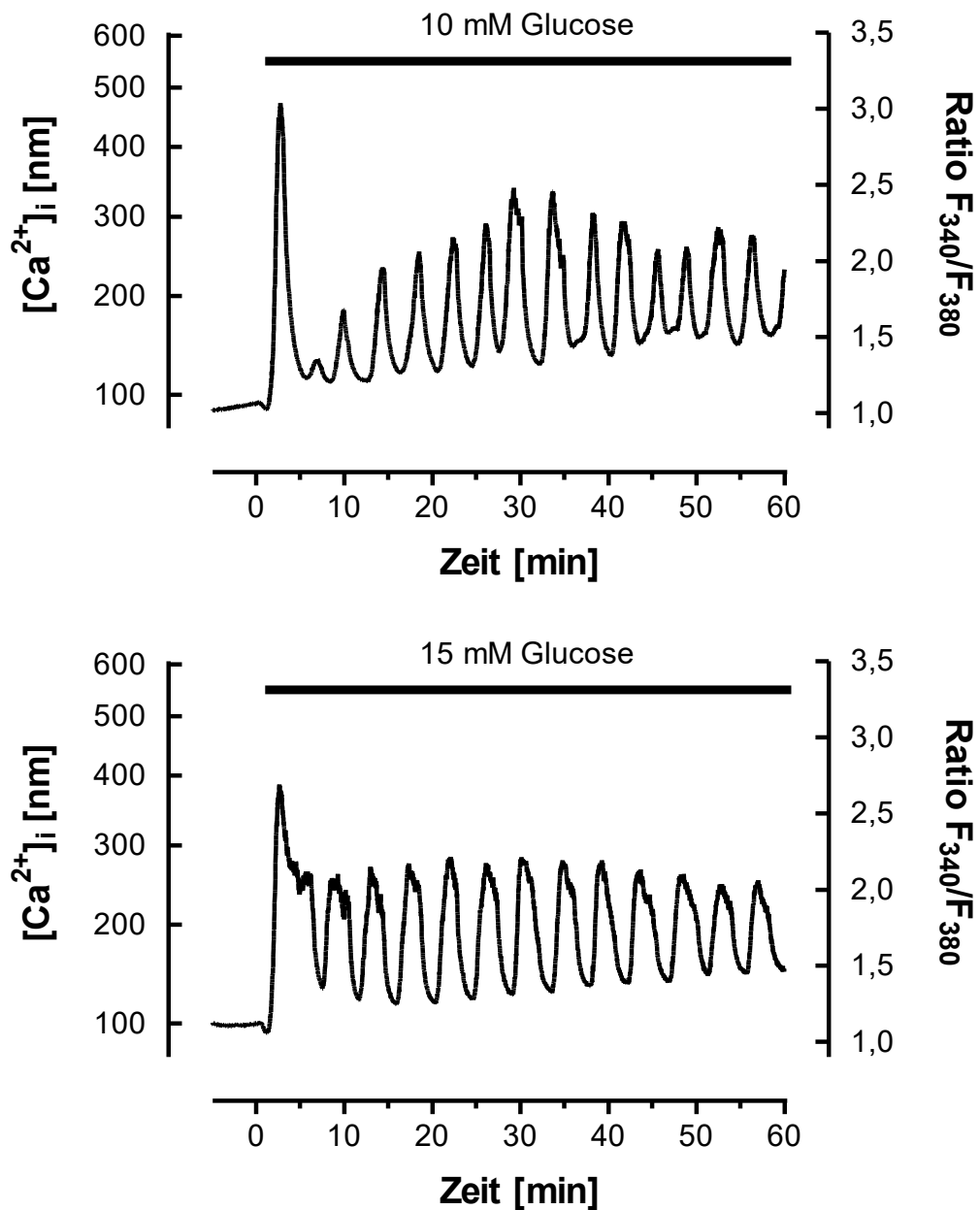


Abb. 8: Einfluß von Glucose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 10 mM (oben) oder 15 mM (unten).

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Glucose ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus 11 bzw. 6 Versuchen.

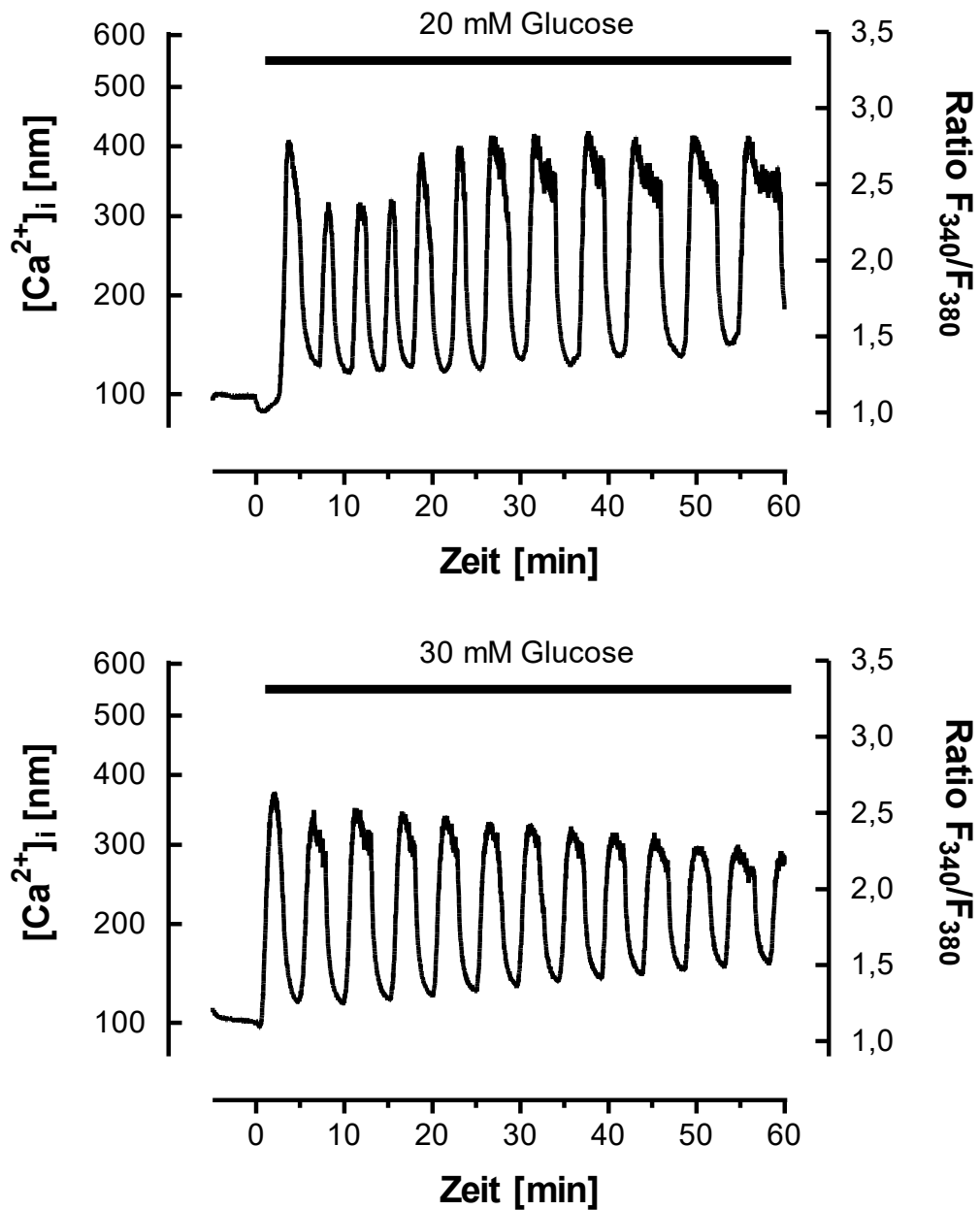


Abb. 9: Einfluß von Glucose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 20 mM (oben) oder 30 mM (unten).

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Glucose ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus 4 bzw. 3 Versuchen.

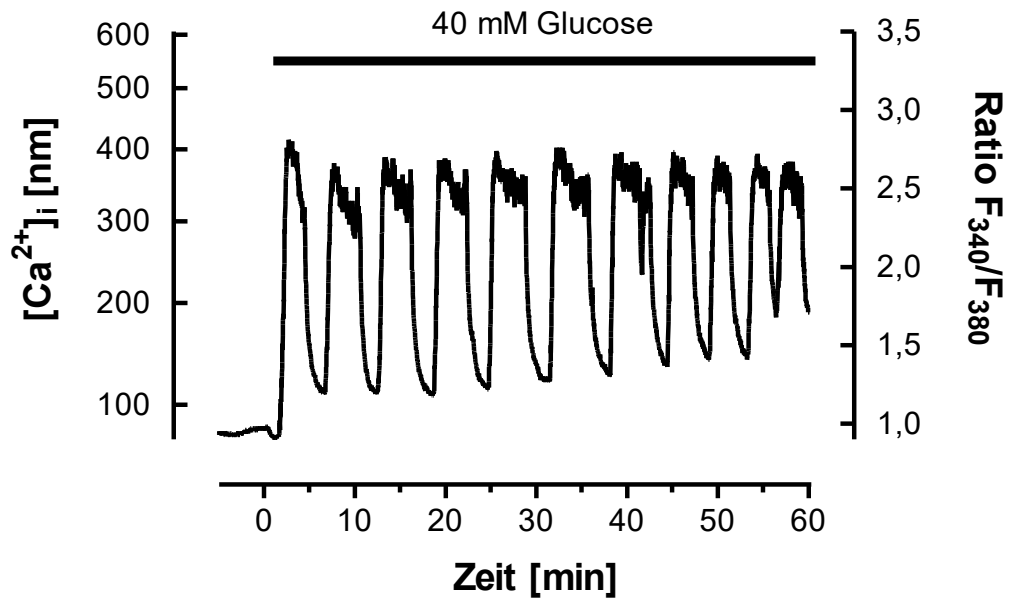


Abb. 10: Einfluß von Glucose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 40 mM.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Glucose ist durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 3 Versuchen.

### 3.1.1.1 Abhängigkeit der Frequenz der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ und der mittleren Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln von der Glucosekonzentration

Bei der Stimulation von isolierten Pankreasinseln der Maus mit Glucose ergab sich im Konzentrationsbereich zwischen 15 und 20 mM eine Konzentrationsabhängigkeit der Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ . In diesem Bereich kam es zu einer Halbierung der Oszillationsfrequenz, die dann aber bei einer weiteren Erhöhung der Glucosekonzentration auf 30 bzw. 40 mM konstant blieb (Tabelle 3). Ebenfalls in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration änderte sich das Muster der  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen. Zeigten sich bei einer Glucosekonzentration von 10 und 15 mM annähernd sinusförmige Oszillationen mit Tälern und Spitzen gleicher Breite, ergaben sich ab einer Glucosekonzentration von 20 mM rechteckförmige Muster der  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen, wobei die Breite der oberen Plateaus größer war als die der Täler. Auch die Änderung der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  zeigte eine Konzentrationsabhängigkeit, wobei diese mit steigender Glucosekonzentration eine Erhöhung erfuhr.

Tabelle 3: Vergleich der Frequenzen der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration.

Glucose- konzentration [mM ]	Frequenz [min <sup>-1</sup> ]
10	0,42 ± 0,03 (11)
15	0,42 ± 0,02 (6)
20	0,21 ± 0,03 (4)
30	0,21 ± 0,03 (3)
40	0,21 ± 0,05 (3)

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

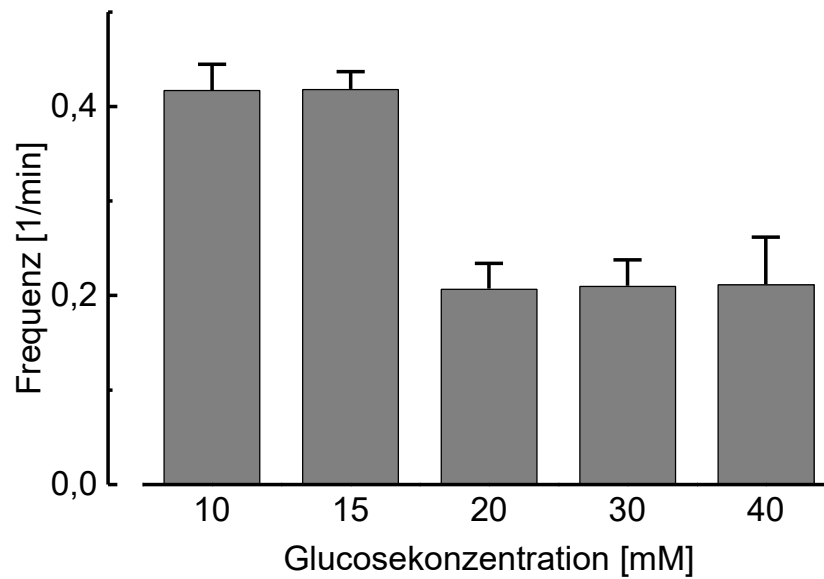


Abb. 11: Abhängigkeit der Frequenzen der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus von der Glucosekonzentration.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationsfrequenzen, die sich aus Tabelle 3 ergeben. Die Konzentrationsabhängigkeit der Frequenz ist signifikant für  $p < 0,01$  (ANOVA).



Tabelle 4: Vergleich der Änderung der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration.

Glucose- konzentration [mM]	Änderung der mittleren $[Ca^{2+}]_i$ [nM]
10	$61 \pm 3$ (21)
15	$85 \pm 6$ (6)
20	$85 \pm 13$ (3)
30	$90 \pm 10$ (6)
40	$110 \pm 11$ (5)

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

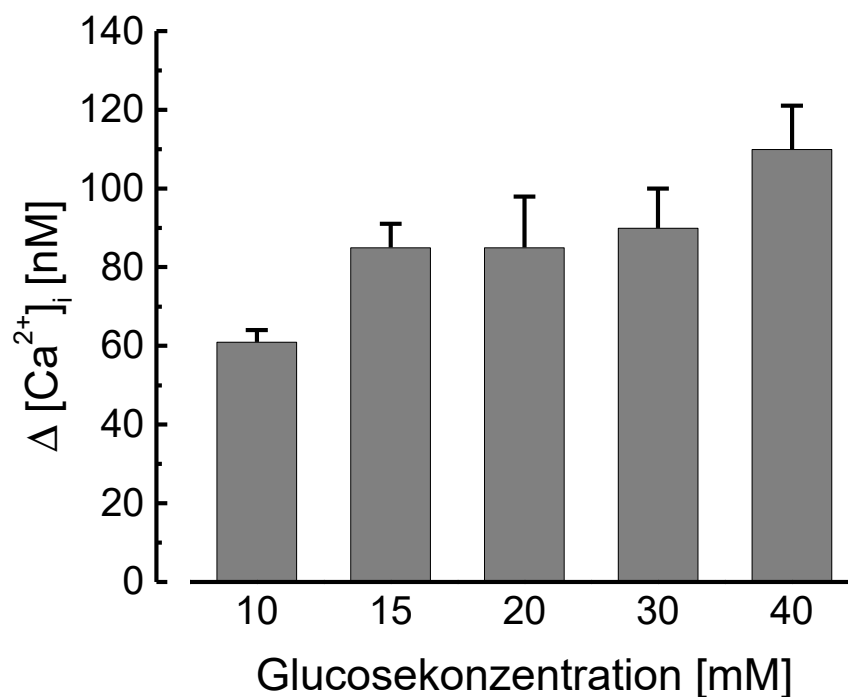


Abb. 12: Abhängigkeit der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus von der Glucosekonzentration.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der  $[Ca^{2+}]_i$ . Die Konzentrationsabhängigkeit der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  ist signifikant für  $p < 0,01$  (ANOVA).

---

### **3.1.1.2 Einfluß von Mannoheptulose auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit 10 oder 15 mM Glucose**

Untersucht wurde der Einfluß von Mannoheptulose (2 mM), einem Inhibitor der glucoseinduzierten Insulinsekretion und der Glucokinase, auf die glucoseinduzierten langsamen  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in isolierten Pankreasinseln. Bei einer Stimulation mit 10 bzw. 15 mM Glucose unterdrückte Mannoheptulose (2 mM) die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen des  $[Ca^{2+}]_i$  reversibel (Abb. 13).

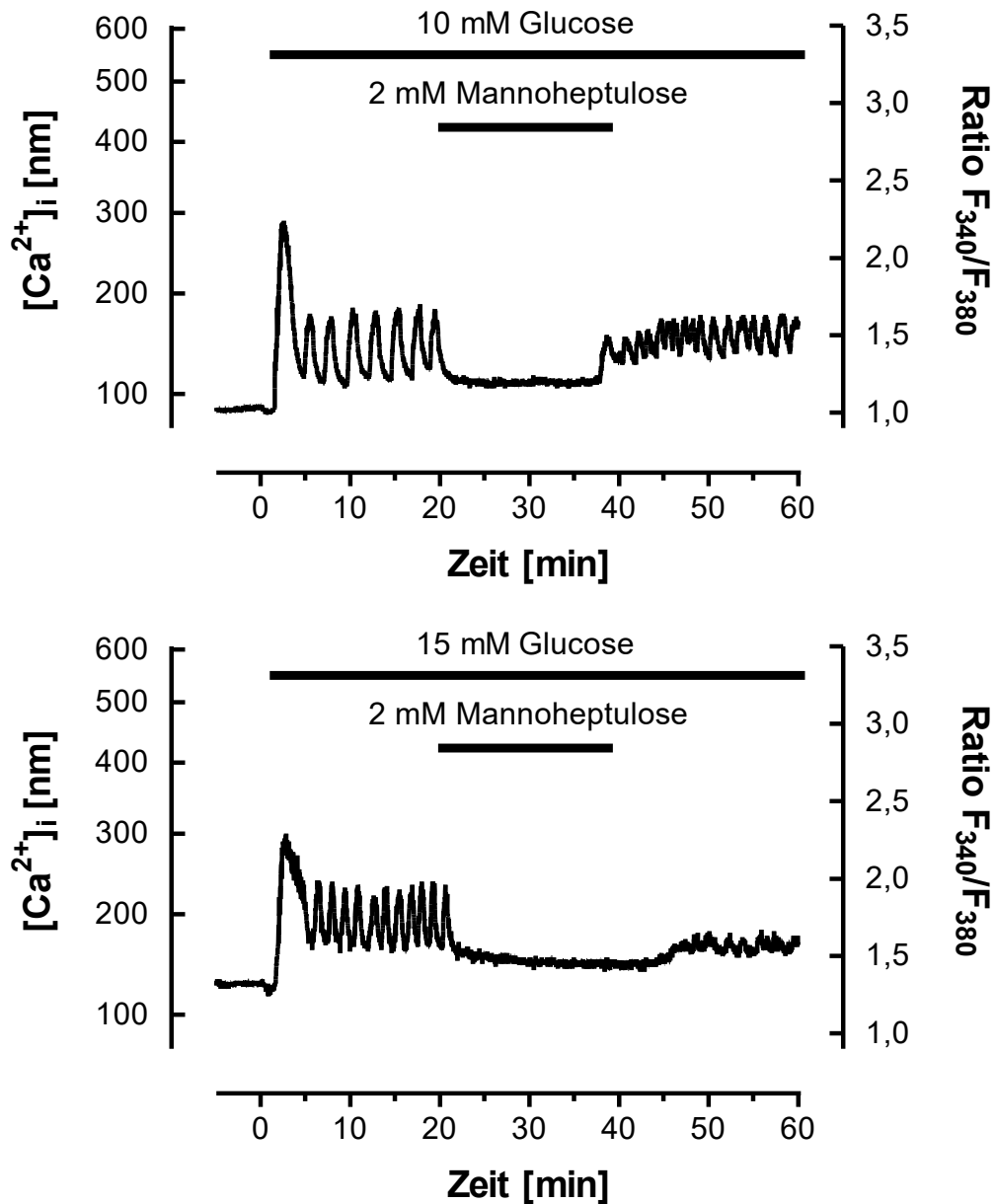


Abb. 13: Einfluß von Mannoheptulose (2 mM) auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Stimulation mit 10 (oben) oder 15 mM Glucose (unten).

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium zusätzlich mit Mannoheptulose (2 mM) versetzt, welche nach weiteren 20 min wieder aus dem Testmedium entfernt wurde. Die Dauer der Stimulation mit Glucose (10 oder 15 mM) bzw. die Zugabe von Mannoheptulose (2 mM) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus 5 bzw. 4 Versuchen.

---

### 3.1.1.3 Einfluß von Adrenalin auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln

Untersucht wurde der Einfluß von Adrenalin (100 nM) auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln. Der Einfluß des Adrenalins auf die, zeigte sich in einer initialen kurzen Unterdrückung der Oszillationen, die sich nach wenigen Minuten wieder einstellten (Abb. 14 und Abb. 15). Es zeigte sich, daß bei einer Stimulation mit 10 oder 15 mM Glucose (Abb. 14) der Einfluß von Adrenalin eine Verlangsamung der Oszillationsfrequenz bewirkte, wobei das Oszillationsmuster unbeeinflusst blieb. Bei einer Stimulation mit 20 mM Glucose (Abb. 15) zeigte sich keine Änderung der Oszillationsfrequenz der  $[Ca^{2+}]_i$  (Tabelle 5). Bei dieser Konzentration kam es unter dem Einfluß von Adrenalin jedoch zu einer Veränderung des Oszillationsmusters. Die rechteckförmige Oszillation der  $[Ca^{2+}]_i$  ging in eine sinusförmige über, bei der Spitzen und Täler die gleiche Breite hatten. Bei allen getesteten Glucosekonzentrationen konnte Adrenalin schnelle oder irreguläre Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in die in Abb. 14 und Abb. 15 gezeigten langsamen und regelmäßigen transformieren (nicht dargestellt).

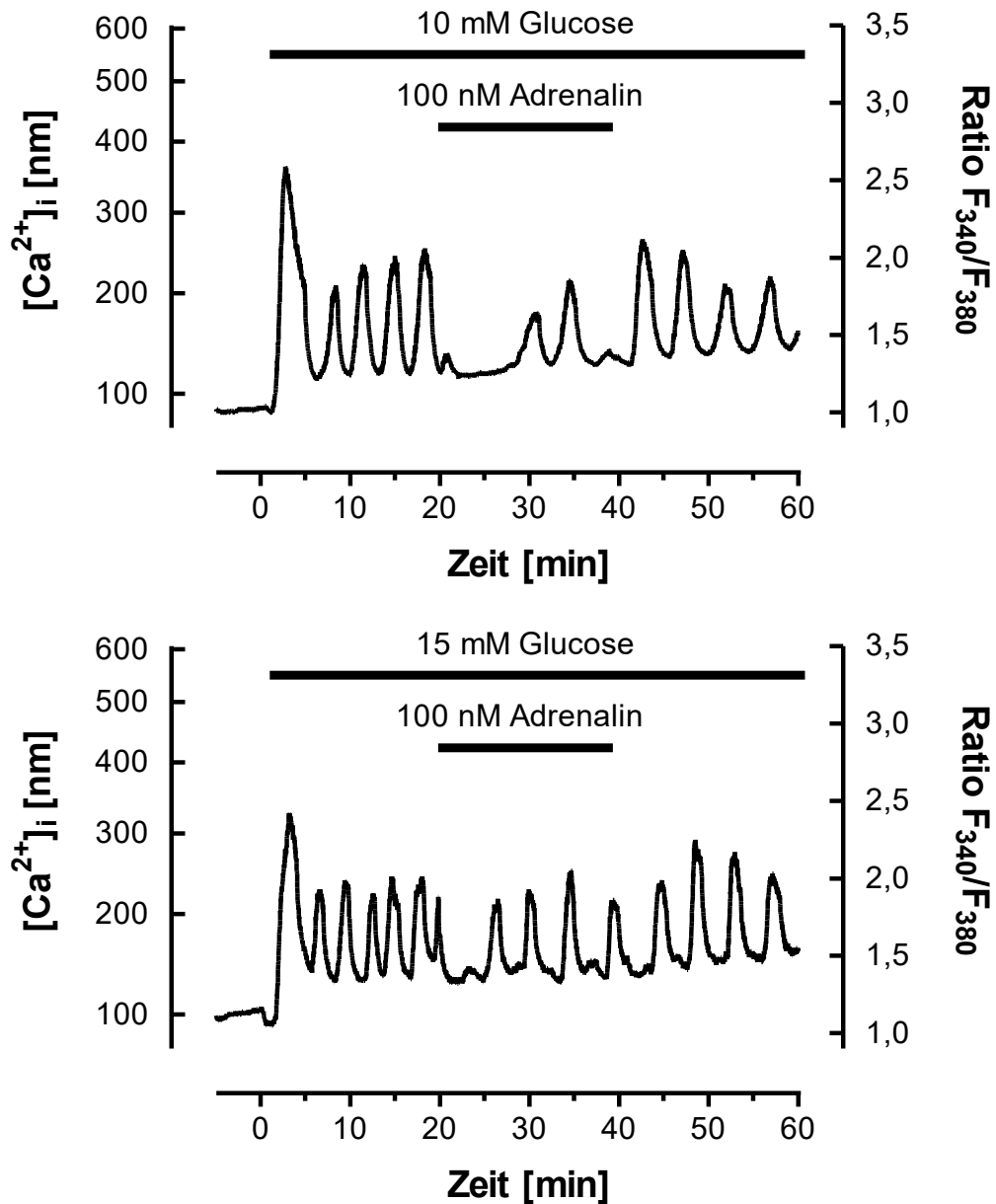


Abb. 14: Einfluß von Adrenalin (100 nM) auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Stimulation mit 10 (oben) oder 15 mM (unten) Glucose.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug jeweils 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium zusätzlich mit Adrenalin versetzt, die nach weiteren 20 min wieder aus dem Testmedium entfernt wurde. Die Dauer der Stimulation mit Glucose (10 oder 15 mM) bzw. die Zugabe von Adrenalin (100 nM) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus 7 bzw. 6 Versuchen.

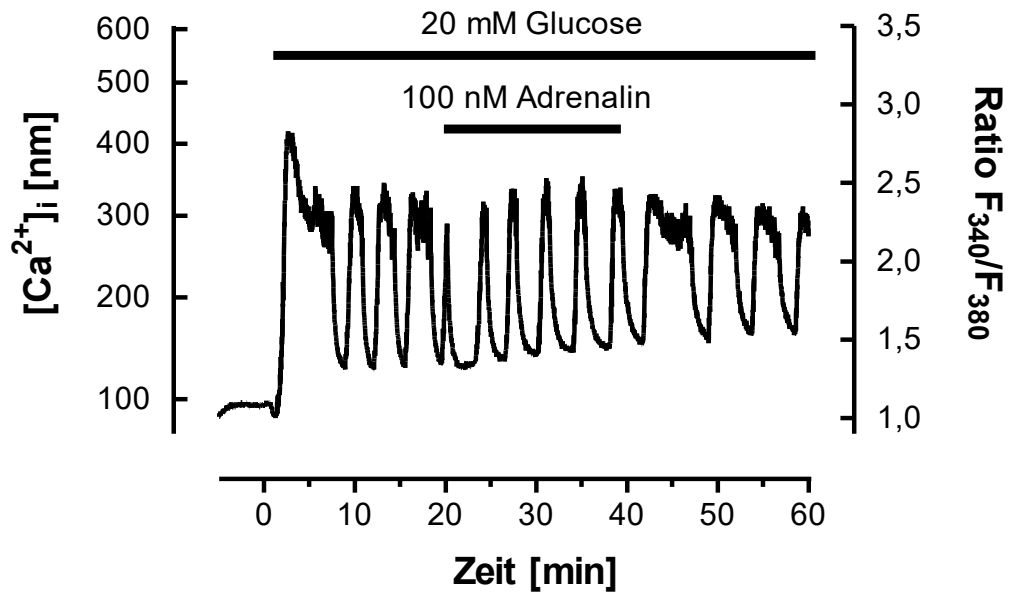


Abb. 15: Einfluß von Adrenalin (100 nM) auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Stimulation mit 20 mM Glucose.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug jeweils 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium zusätzlich mit Adrenalin (100 nM) versetzt, die nach weiteren 20 min wieder aus dem Testmedium entfernt wurde. Die Dauer der Stimulation mit Glucose (20 mM) bzw. die Zugabe von Adrenalin (100 nM) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 5 Versuchen.

Tabelle 5: Vergleich der Frequenzen der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  bei An- und Abwesenheit von Adrenalin in isolierten Pankreasinseln der Maus in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration.

Glucose-konzentration [mM]	Adrenalin-konzentration [nM]	Frequenz [ $min^{-1}$ ]
10	0	$0,42 \pm 0,03$ (11)
10	100	$0,33 \pm 0,03$ (7)*
15	0	$0,42 \pm 0,02$ (6)
15	100	$0,33 \pm 0,03$ (6)*
20	0	$0,21 \pm 0,03$ (4)
20	100	$0,26 \pm 0,05$ (5)

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

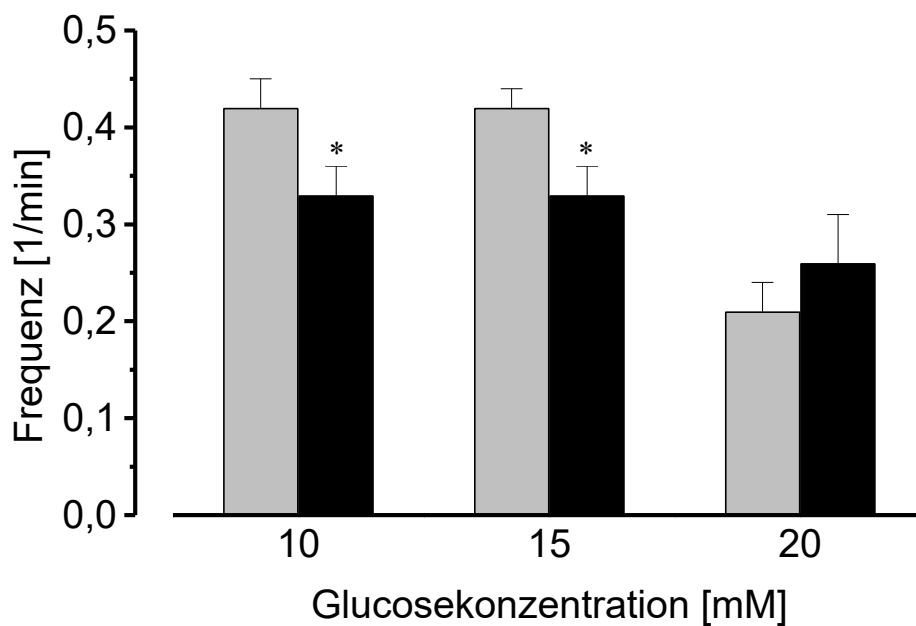


Abb. 16: Vergleich der Frequenzen der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  bei Anwesenheit (schwarze Säulen) und Abwesenheit (graue Säulen) von Adrenalin in isolierten Pankreasinseln der Maus in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationsfrequenzen, die sich aus Tabelle 5 ergeben. Die Änderungen der Frequenz bei einer Glucosekonzentration von 10 und 15 mM sind signifikant (\*:  $p < 0,05$ ), die Änderungen bei einer Glucosekonzentration von 20 mM sind nicht signifikant.

---

#### **3.1.1.4 Kombiniertes Einfluß von Adrenalin und Mannoheptulose auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von Adrenalin (100 nM) und Mannoheptulose (2 mM) auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln. Wie schon in Kapitel 3.1.1.2 gezeigt, unterdrückte Mannoheptulose die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen des  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln der Maus. Es zeigte sich, daß auch die durch Adrenalin beeinflussten Oszillationen des  $[Ca^{2+}]_i$  von Mannoheptulose komplett unterdrückt wurden.



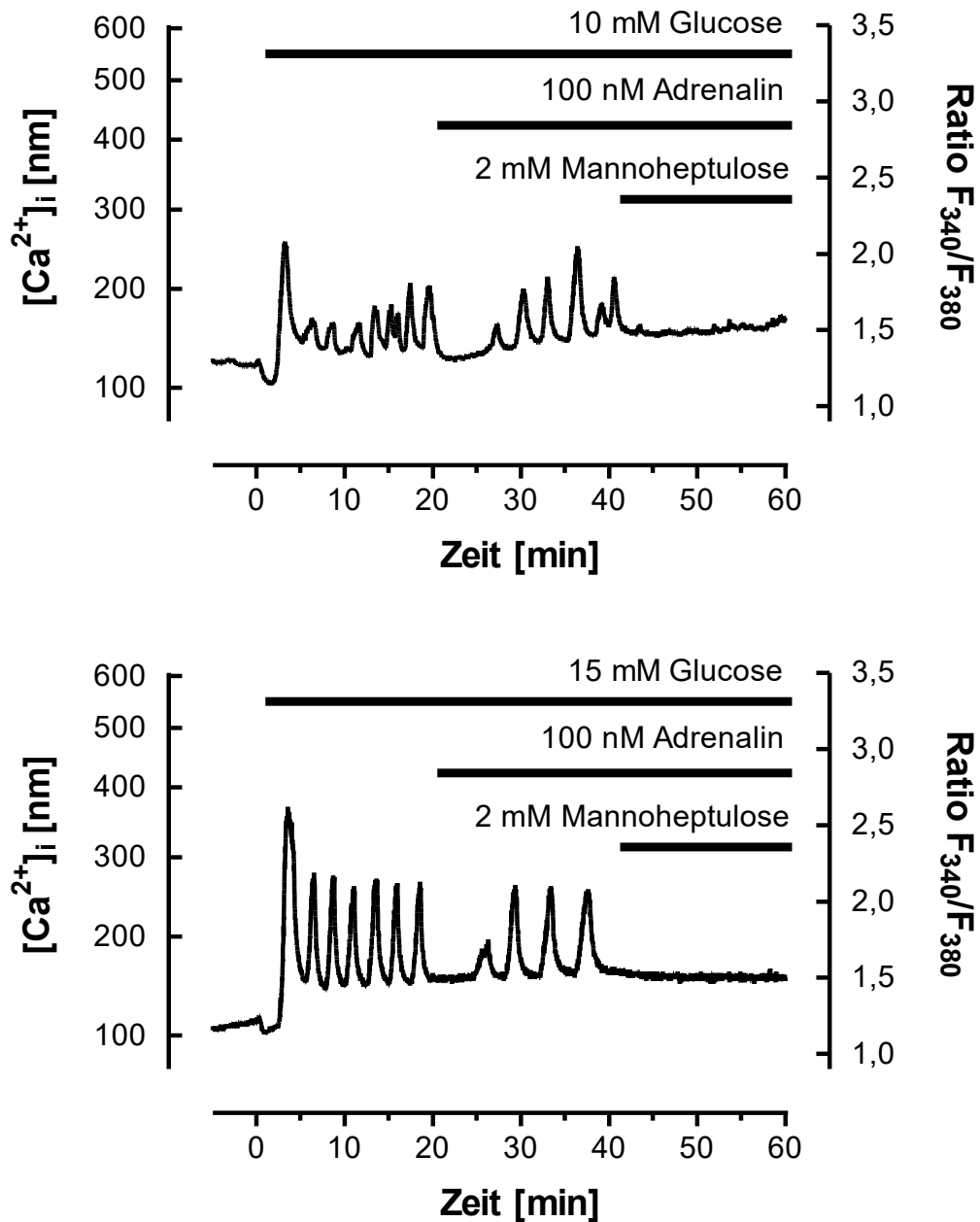


Abb. 17: Kombiniertes Einfluß von Adrenalin (100 nM) und Mannoheptulose (2 mM) auf die glucoseinduzierten langsamen  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Stimulation mit 10 (oben) oder 15 mM Glucose (unten).

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium (10 oder 15 mM Glucose) erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug jeweils 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium mit Adrenalin versetzt und nach weiteren 20 min zusätzlich mit Mannoheptulose. Die Dauer der Stimulation mit Glucose (10 oder 15 mM) bzw. die Zugaben von Adrenalin (100 nM) und Mannoheptulose (2 mM) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus jeweils 4 Versuchen.

### 3.1.1.5 Einfluß einer hohen extrazellulären Kaliumkonzentration auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln

Untersucht wurde der Einfluß einer hohen extrazellulären Kaliumkonzentration (20 mM) auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln bei einer Glucosekonzentration von 15 mM. Es zeigte sich, daß KCl bei einer Konzentration von 20 mM alle langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  auslöschte und die  $[Ca^{2+}]_i$  auf einem erhöhten Plateau verblieb.

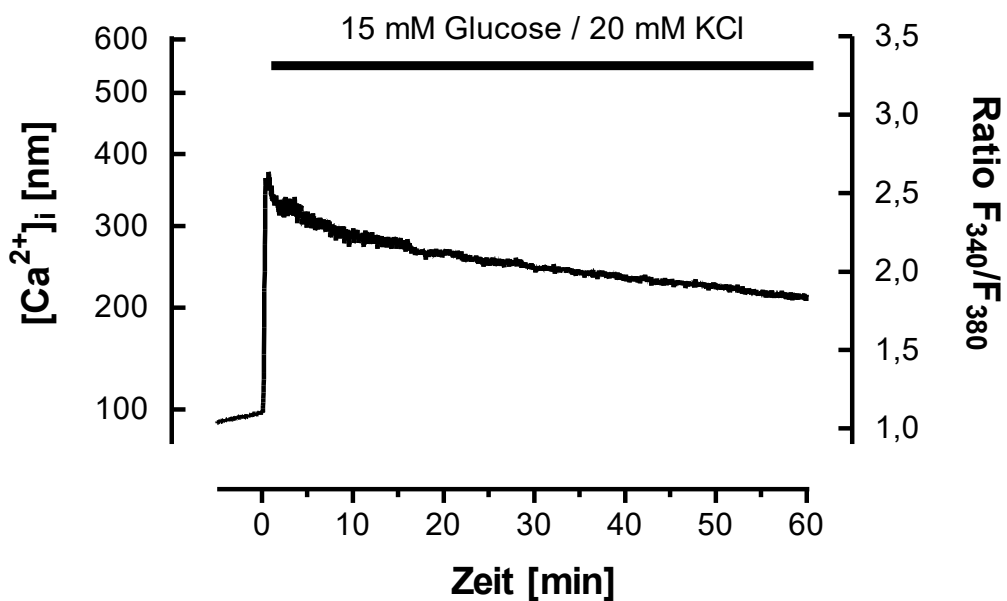


Abb 18: Einfluß von KCl (20 mM) plus Glucose (15 mM) auf die glucoseinduzierten langsamen  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in isolierten Pankreasinseln der Maus.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium (20 mM KCl plus 15 mM Glucose) erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug jeweils 5 min. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 3 Versuchen.

### 3.1.2 Einfluß von Mannose auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Isolierte Pankreasinseln

Untersucht wurde auch der Einfluß der Hexose Mannose, einem schwachen Stimulator der Insulinsekretion, auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln. Die Stimulation wurde mit einer Mannosekonzentration von 40 mM durchgeführt. Mannose induzierte zunächst einen kurzzeitigen, leichten Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ , dem ein transientser Anstieg folgte. Diesem schlossen sich spontane Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  mit langsamer Frequenz an (Abb. 19). Niedrigere Mannosekonzentrationen zeigten keine oder irreguläre Oszillationen (nicht dargestellt).

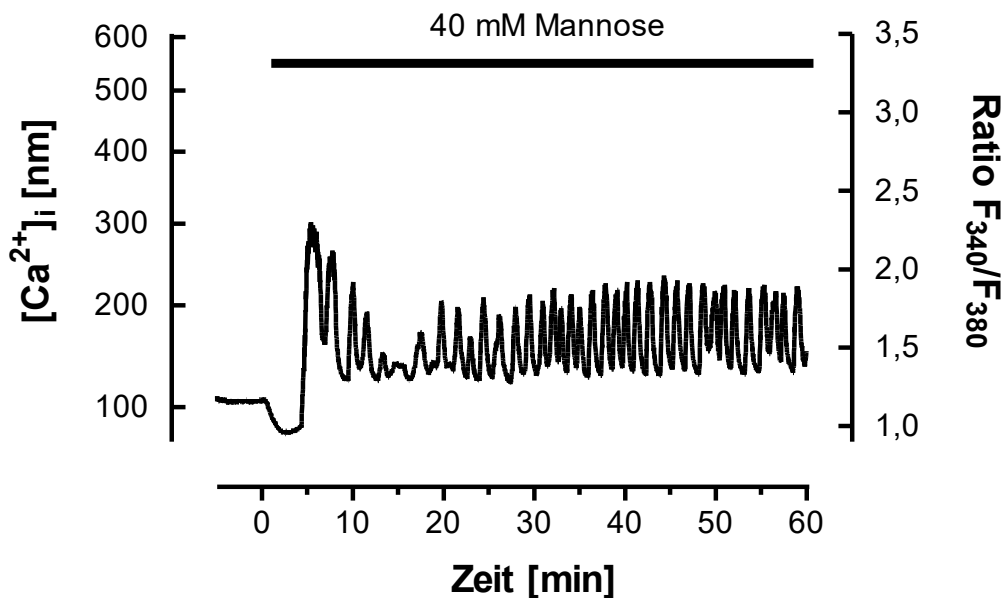


Abb. 19: Einfluß von Mannose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Erhöhung der Mannosekonzentration von 0 mM auf 40 mM.

Der Wechsel vom Basalmedium (ohne Mannose) zum Testmedium erfolgte zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Mannose (40 mM) ist durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 4 Versuchen.

### 3.1.2.1 Vergleich der Frequenzen von mannose- und glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln

Tabelle 6: Vergleich der Frequenzen von mannose- und glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus.

Hexose- konzentration [mM]	Frequenz [min <sup>-1</sup> ] (Anzahl der Versuche)
Mannose 40	0,65 ± 0,04 (4)
Glucose 10	0,42 ± 0,03 (11)
Glucose 20	0,21 ± 0,03 (4)

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

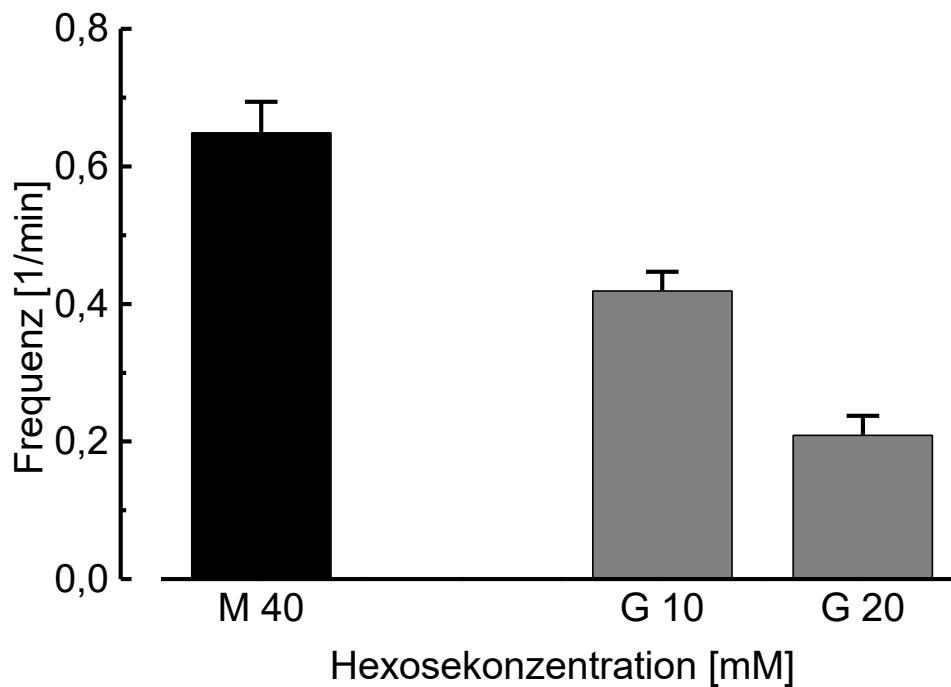


Abb. 20: Vergleich der Frequenzen von mannose- (M) und glucoseinduzierten (G) langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus.

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationsfrequenzen, die sich aus Tabelle 6 ergeben.

### **3.1.3 Einfluß verschiedener Glycerinaldehydkonzentrationen (3 und 10 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von Glycerinaldehyd (3 und 10 mM), einem glykolytischen Substrat und Stimulator der Insulinsekretion, auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln. Glycerinaldehyd induzierte zunächst einen kurzzeitigen leichten Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ , dem bei 10 mM (jedoch nicht bei 3 mM) ein geringer transients Anstieg folgte, der auf ein gegenüber der Basalkonzentration erhöhtes Niveau zurückfiel (Abb. 21). Spontane Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  wurden bei der Stimulation mit Glycerinaldehyd nicht beobachtet.

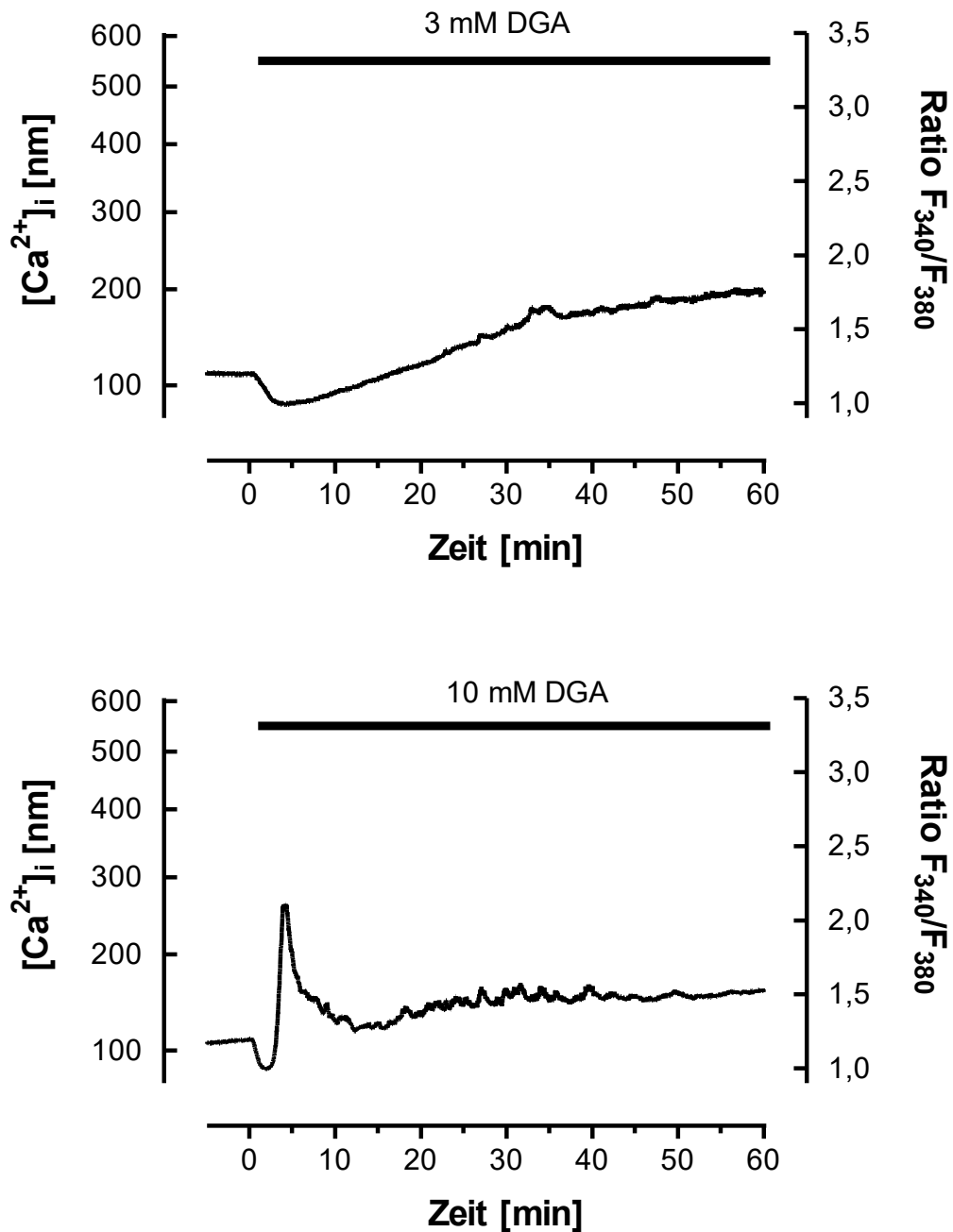


Abb. 21: Einfluß von Glycerinaldehyd (GA) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Erhöhung der Glycerinaldehydkonzentration von 0 mM auf 3 mM (oben) oder 10 mM (unten).

Der Wechsel vom Basalmedium (ohne Glycerinaldehyd) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Glycerinaldehyd ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus jeweils 4 Versuchen.

---

### **3.1.3.1 Einfluß verschiedener Glycerinaldehydkonzentrationen (3 und 10 mM) in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen (5 und 10 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von Glycerinaldehyd auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln nach einer Erhöhung der Glycerinaldehydkonzentration auf 3 oder 10 mM plus Glucose (5 bzw. 10 mM). Glycerinaldehyd induzierte in der Gegenwart von Glucose zunächst einen kurzzeitigen, leichten Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ , dem ein transientser Anstieg folgte. Diesem schlossen sich spontane langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  an (Abb. 22 und Abb. 23).

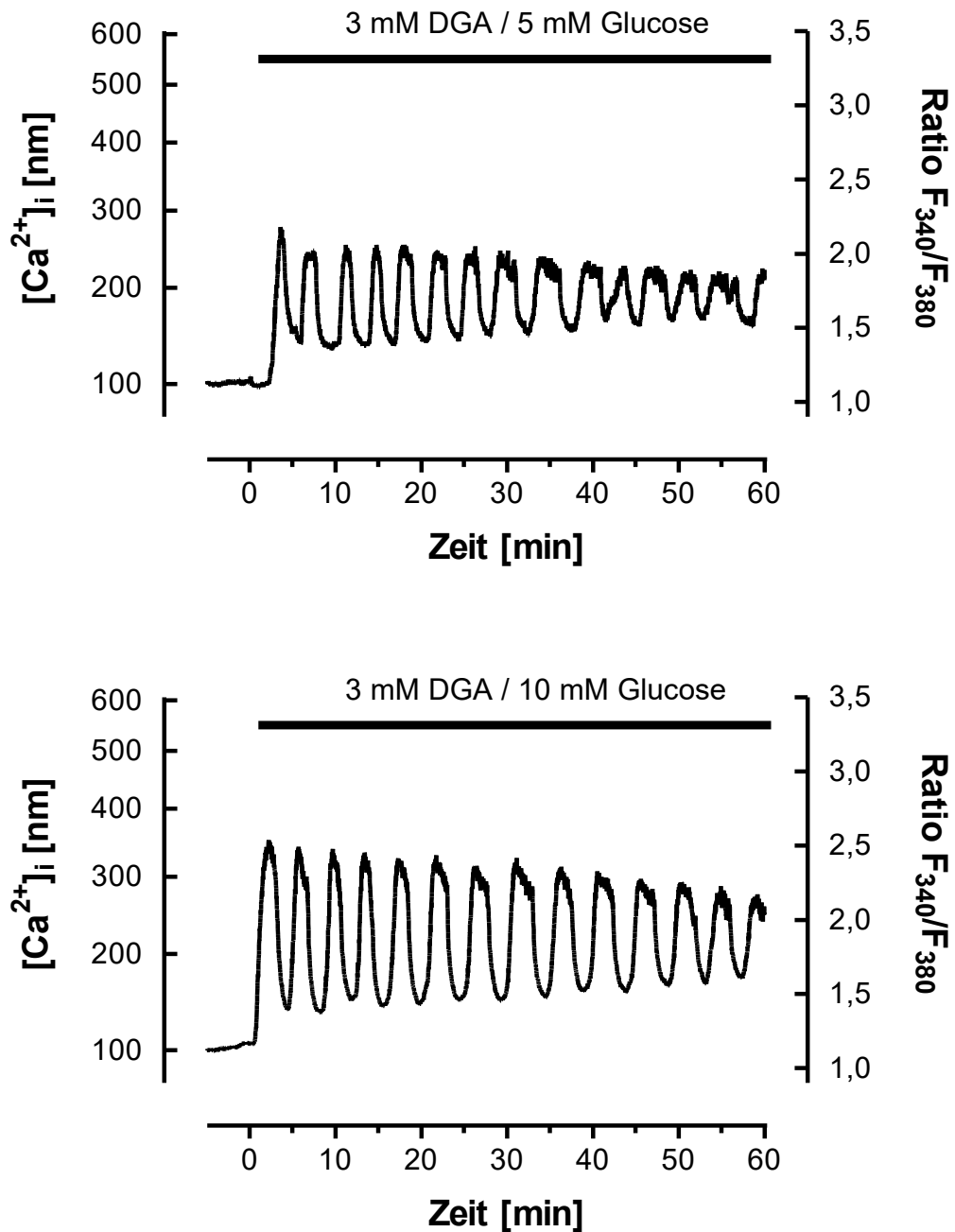


Abb. 22: Einfluß von Glycerinaldehyd (GA) (3 mM) plus 5 (oben) oder 10 mM Glucose (unten) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Glycerinaldehyd (3 mM) und Glucose (5 oder 10 mM) ist durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus jeweils 5 Versuchen.



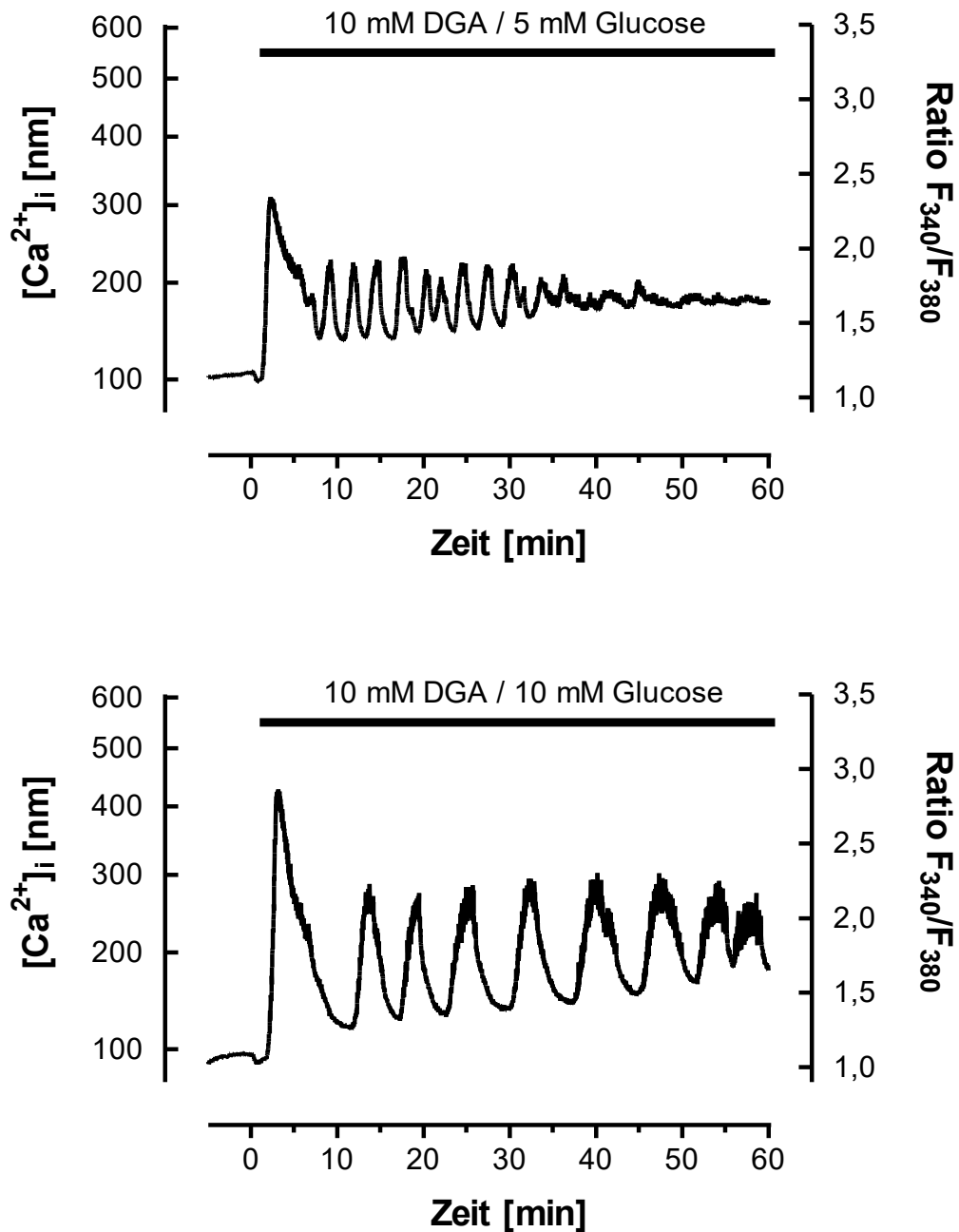


Abb. 23: Einfluß von Glycerinaldehyd (GA) (10 mM) plus 5 (oben) oder 10 mM Glucose (unten) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Glycerinaldehyd (10 mM) plus Glucose (5 oder 10 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus jeweils 4 Versuchen.

### 3.1.3.2 Abhängigkeit der Frequenz der durch Glycerinaldehyd plus Glucose induzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln von der Glucosekonzentration

Tabelle 7: Vergleich der Frequenzen der durch Glycerinaldehyd plus Glucose induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus in Abhängigkeit von der Glycerinaldehyd- und der Glucosekonzentration.

Glycerinaldehyd-konzentration [mM]	Glucose-konzentration [mM]	Frequenz [ $\text{min}^{-1}$ ]
3	5	$0,38 \pm 0,07$ (3)
3	10	$0,24 \pm 0,02$ (3)
10	5	$0,29 \pm 0,04$ (4)
10	10	$0,23 \pm 0,03$ (6)
0	10	$0,42 \pm 0,03$ (5)
0	20	$0,21 \pm 0,03$ (4)

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

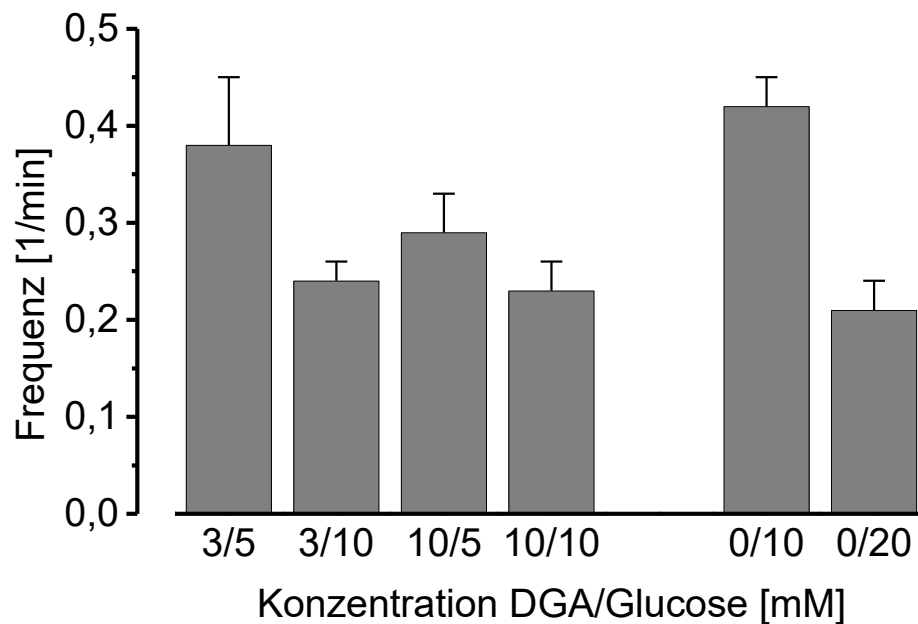


Abb. 24: Vergleich der Frequenzen der durch Glycerinaldehyd plus Glucose induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus in Abhängigkeit von der Glycerinaldehyd (DGA)- und der Glucosekonzentration.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationsfrequenzen, die sich aus Tabelle 3 ergeben.

---

### **3.1.3.3 Einfluß von Mannoheptulose auf die langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit Glycerinaldehyd (3 mM) plus Glucose (5 mM)**

Untersucht wurde der Einfluß von Mannoheptulose (2 mM), einem Inhibitor der glucoseinduzierten Insulinsekretion und der Glucokinase, auf die langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln nach Stimulation mit Glycerinaldehyd plus Glucose. In Kapitel 3.1.1.2 ist gezeigt worden, daß Mannoheptulose die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen des  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln der Maus zu unterdrücken vermochte. Es zeigte sich, daß auch die durch Glycerinaldehyd plus Glucose induzierten langsamen Oszillationen des  $[Ca^{2+}]_i$  von Mannoheptulose unterdrückt wurden (Abb. 25).

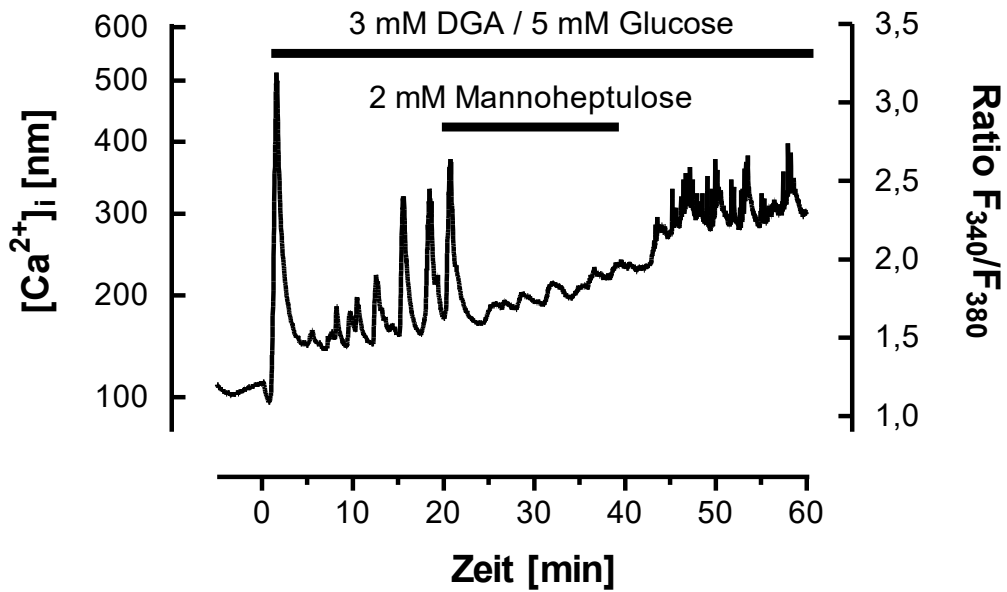


Abb. 25: Einfluß von Mannoheptulose (2 mM) auf die langsamen  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Stimulation mit 3 mM Glycerinaldehyd (DGA) plus 5 mM Glucose.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium zusätzlich mit Mannoheptulose (2 mM) versetzt, welche nach weiteren 20 min wieder aus dem Testmedium entfernt wurde. Die Dauer der Stimulation mit Glycerinaldehyd (3 mM) plus Glucose (5 mM) bzw. die Zugabe von Mannoheptulose (2 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 3 Versuchen.

### 3.1.3.4 Einfluß von Adrenalin auf die langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit Glycerinaldehyd (3 mM) plus Glucose (5 mM)

Untersucht wurde der Einfluß von Adrenalin (100 nM) auf die langsamen Oszillationen  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln nach Stimulation mit Glycerinaldehyd plus Glucose. Wie bei der Stimulation mit Glucose allein kam es bei der Stimulation der isolierten Pankreasinseln mit Glycerinaldehyd plus Glucose unter dem Einfluß von Adrenalin zunächst zu einer initialen kurzen Unterdrückung der Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ , die sich dann mit geringerer Frequenz fortsetzten (Abb. 26).

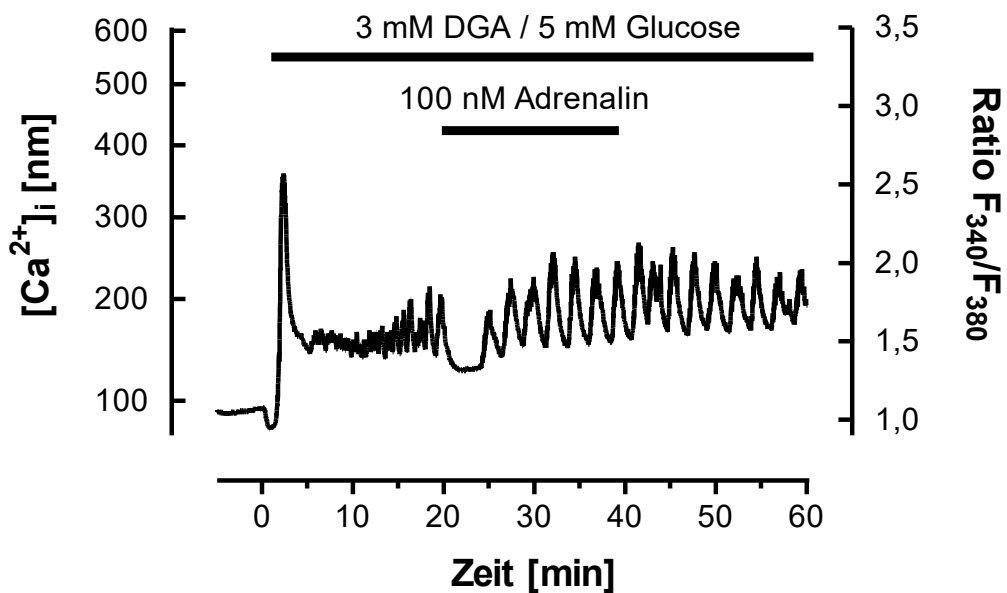


Abb. 26: Einfluß von Adrenalin (100 nM) auf die langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Stimulation mit Glycerinaldehyd (DGA) (3 mM) plus Glucose (5 mM).

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium für einen Zeitraum von 20 min zusätzlich mit Adrenalin (100 nM) versetzt. Die Dauer der Stimulation mit Glycerinaldehyd (3 mM) plus Glucose (5 mM) bzw. die Zugabe von Adrenalin (100 nM) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 4 Versuchen.

### **3.1.4 Einfluß verschiedener Konzentrationen von $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC), dem Desaminierungsprodukt von Leucin, einem mitochondrialen Substrat und Stimulator der Insulinsekretion, auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln mit einer Konzentration von 5 oder 10 mM. KIC induzierte zunächst einen kurzzeitigen leichten Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ , dem bei beiden getesteten Konzentrationen ein transienter Anstieg folgte, der auf das Niveau der Basalkonzentration zurückfiel (Abb. 27). Spontane Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  wurden bei keiner der getesteten Konzentrationen beobachtet.

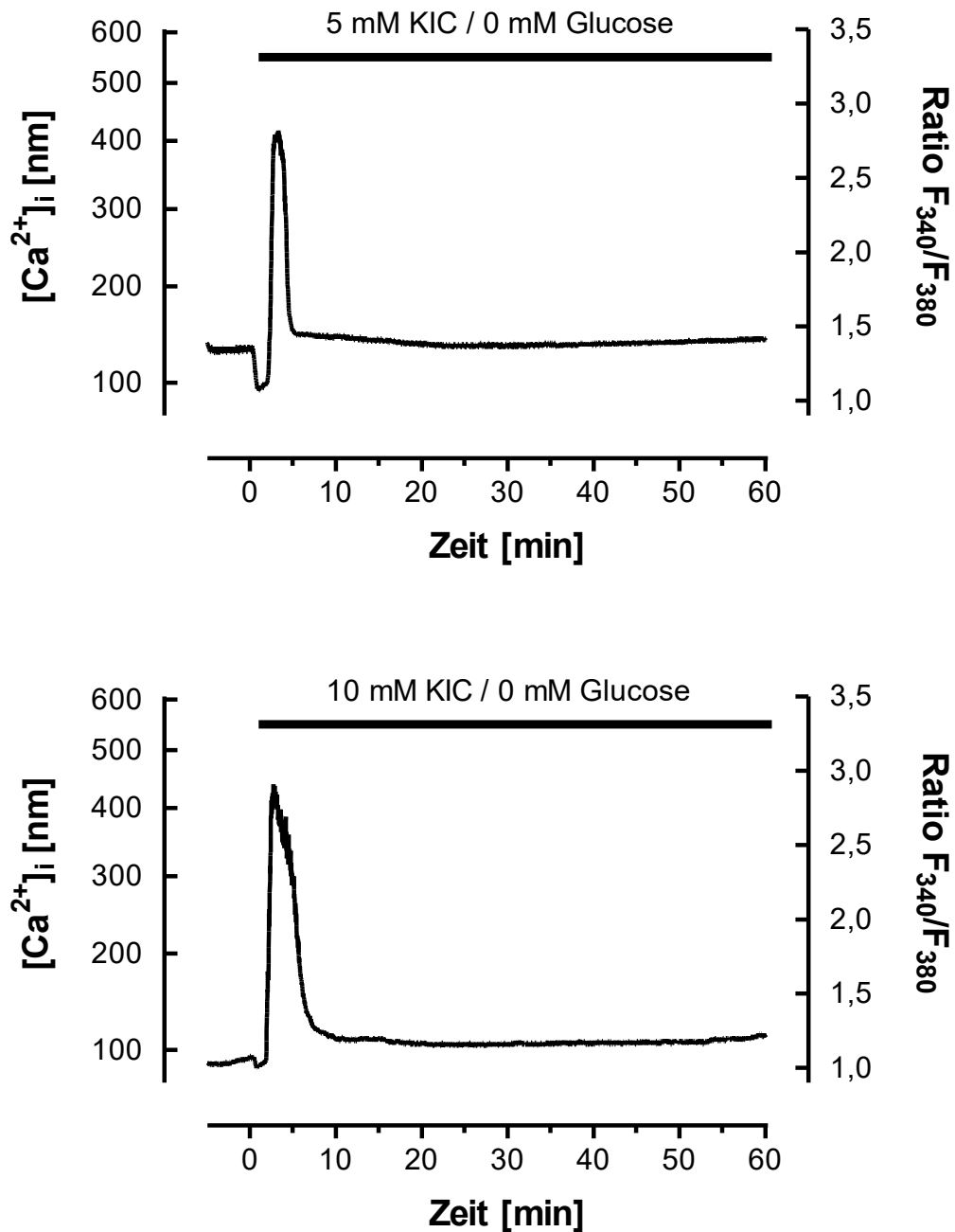


Abb. 27: Einfluß von KIC auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Erhöhung der KIC-Konzentration von 0 mM auf 5 mM (oben) oder 10 mM (unten).

Der Wechsel vom Basalmedium (ohne KIC) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit KIC (5 oder 10 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus jeweils 4 Versuchen.

---

### **3.1.4.1 Einfluß verschiedener Konzentrationen von $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) (5 und 10 mM) in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen (5 und 10 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von KIC auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln in einer Konzentration von 5 oder 10 mM plus Glucose (5 oder 10 mM). KIC induzierte in der Gegenwart von Glucose zunächst einen kurzzeitigen, leichten Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ , dem ein transienter Anstieg folgte. Diesem schlossen sich  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen mit hoher Frequenz und niedriger Amplitude an (Abb. 28 und Abb. 29).



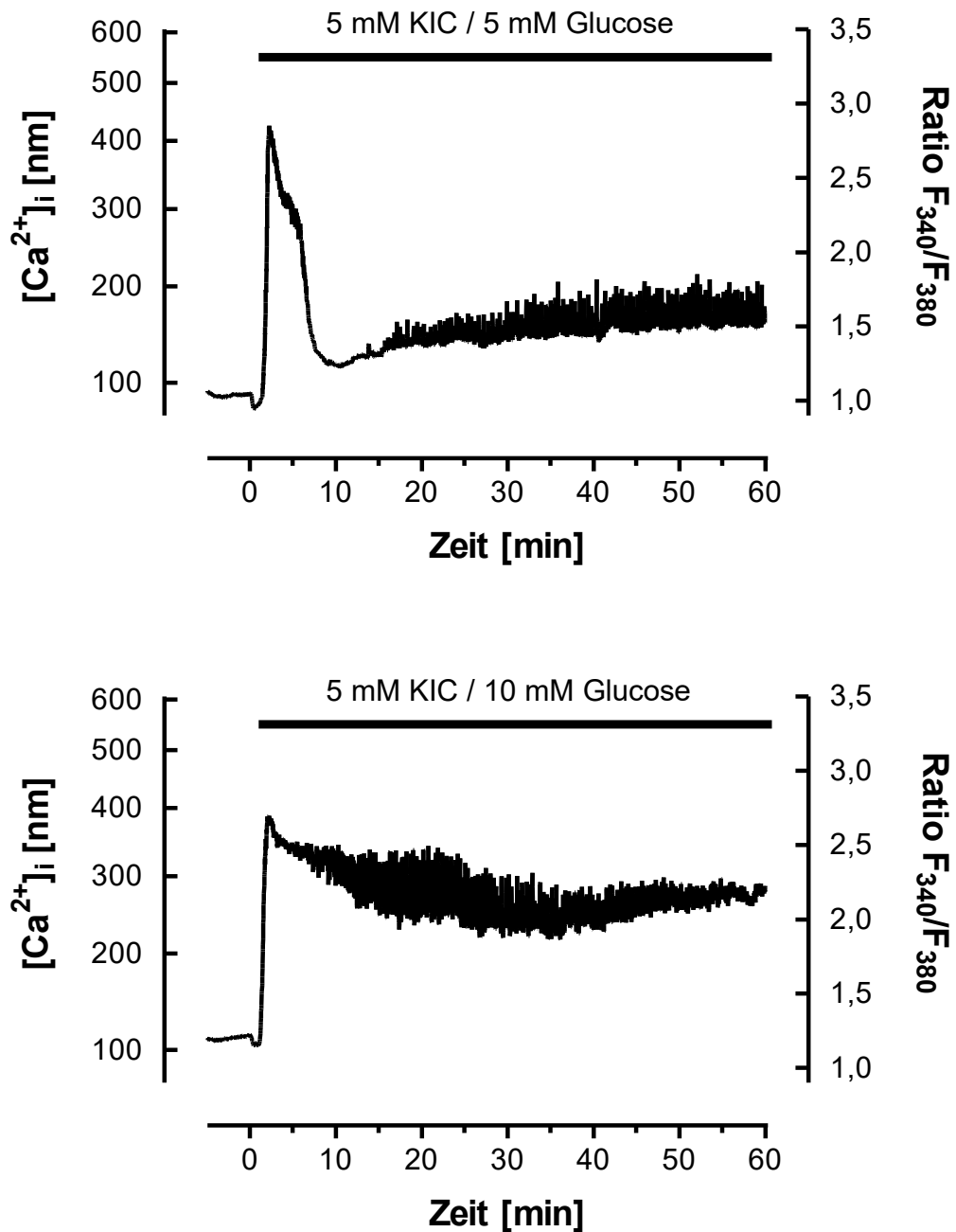


Abb. 28: Einfluß von KIC (5 mM) plus 5 (oben) oder 10 mM Glucose (unten) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit KIC (5 mM) und Glucose (5 oder 10 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus jeweils 4 Versuchen.

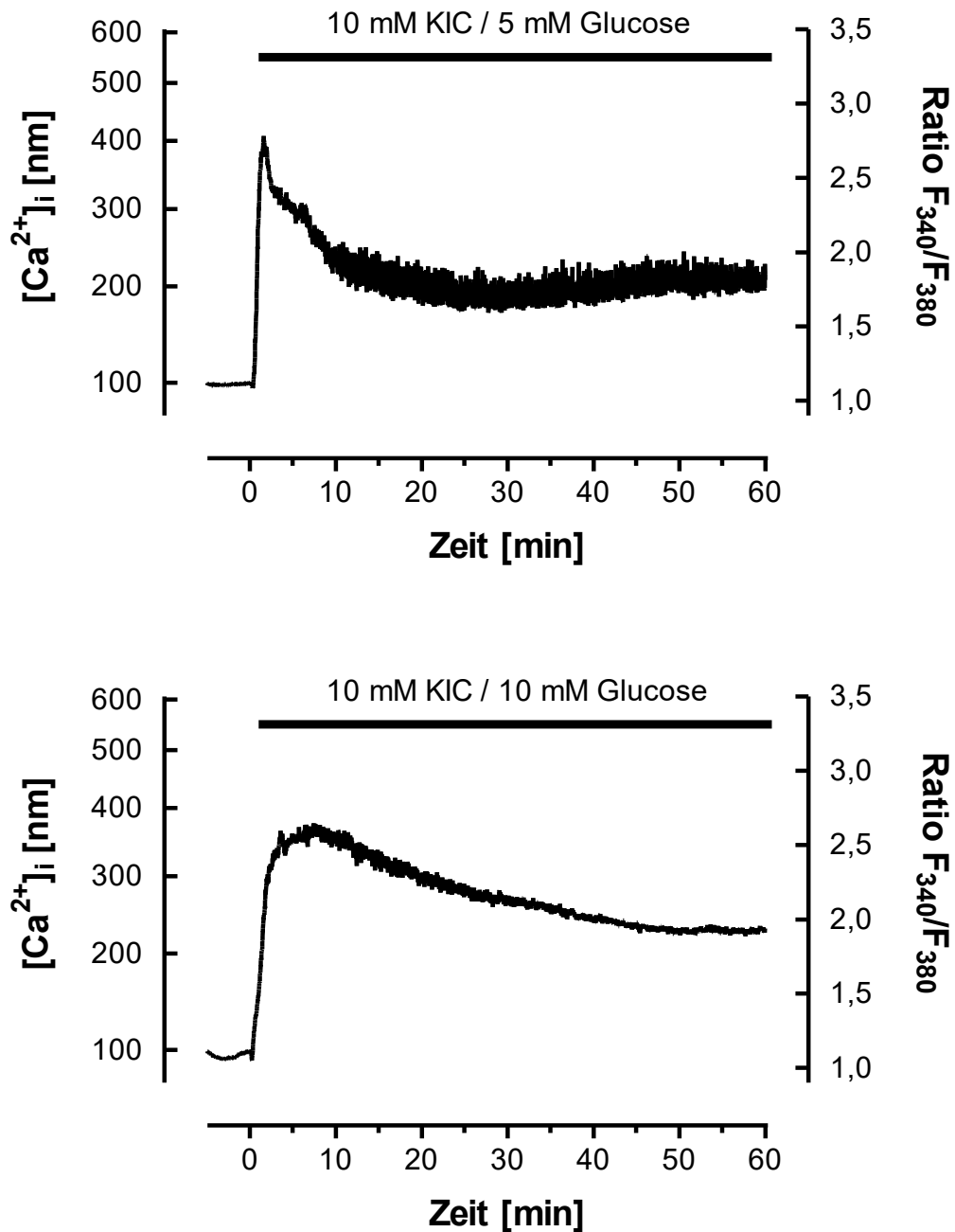


Abb. 29: Einfluß von KIC (10 mM) plus 5 (oben) oder 10 mM Glucose (unten) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit KIC (10 mM) plus Glucose (5 bzw. 10 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus jeweils 4 Versuchen.

---

### **3.1.4.2 Einfluß von Mannoheptulose auf die Antwort der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit $\alpha$ -Ketoisocaprionsäure (KIC) (5 oder 10 mM) plus Glucose (5 oder 10 mM)**

Untersucht wurde der Einfluß von Mannoheptulose (2 mM), einem Inhibitor der glucoseinduzierten Insulinsekretion und der Glucokinase, auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln nach Stimulation mit KIC (5 und 10 mM) plus Glucose (5 und 10 mM). Es zeigte sich, daß auch die durch KIC plus Glucose induzierten schnellen Oszillationen des  $[Ca^{2+}]_i$  von Mannoheptulose reversibel unterdrückt wurden (Abb. 30 und Abb. 31).

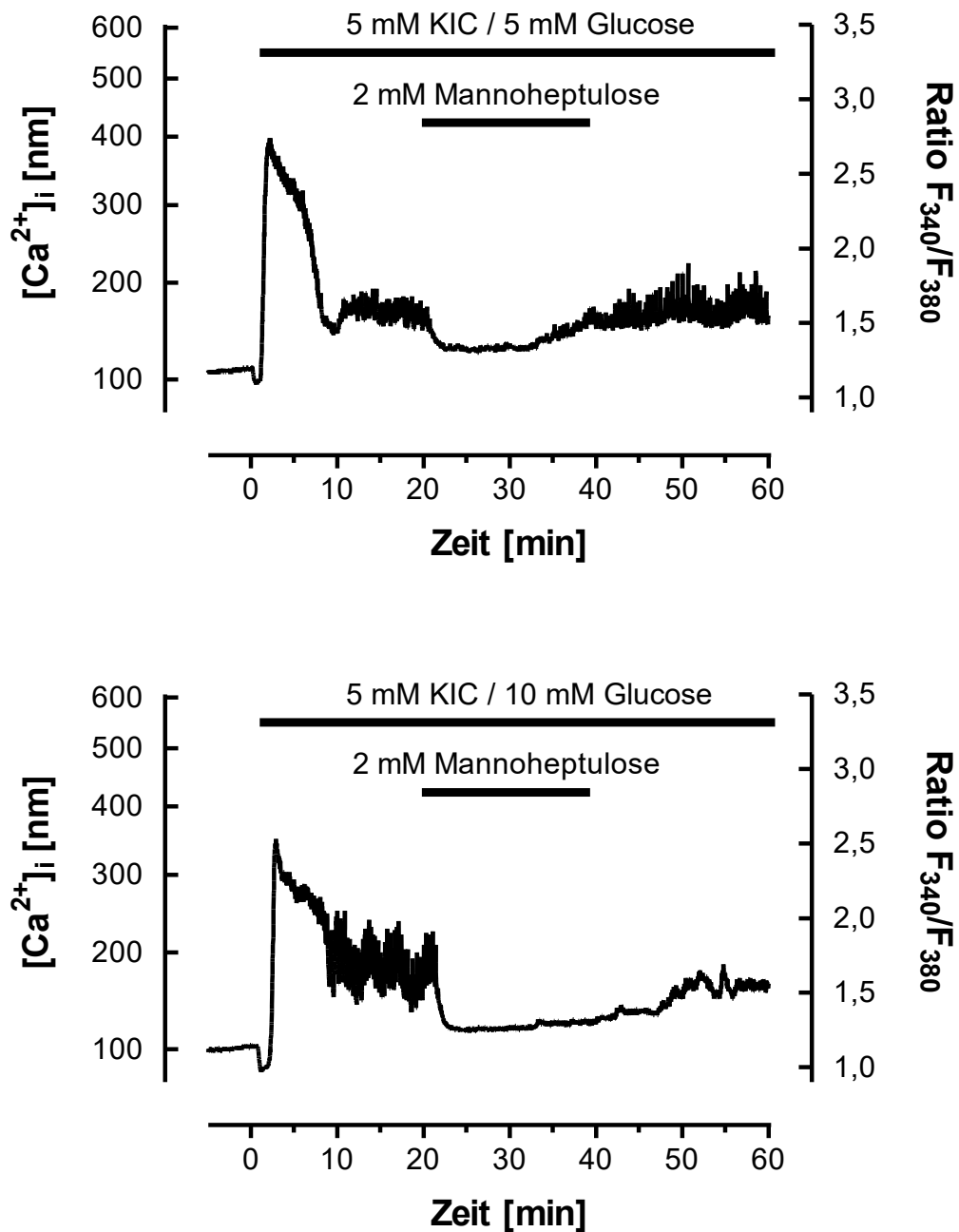


Abb. 30: Einfluß von Mannoheptulose (2 mM) auf die Antwort der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Stimulation mit 5 mM KIC plus 5 mM (oben) oder 10 mM Glucose (unten).

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium (5 mM KIC plus 5 oder 10 mM Glucose bzw. 10 mM KIC plus 5 mM Glucose) erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium zusätzlich mit Mannoheptulose (2 mM) versetzt, welche nach weiteren 20 min wieder aus dem Testmedium entfernt wurde. Die Dauer der Stimulation mit KIC (5 mM) plus Glucose (5 bzw. 10 mM) bzw. die Zugabe von Mannoheptulose (2 mM) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus 5 bzw. 3 Versuchen.

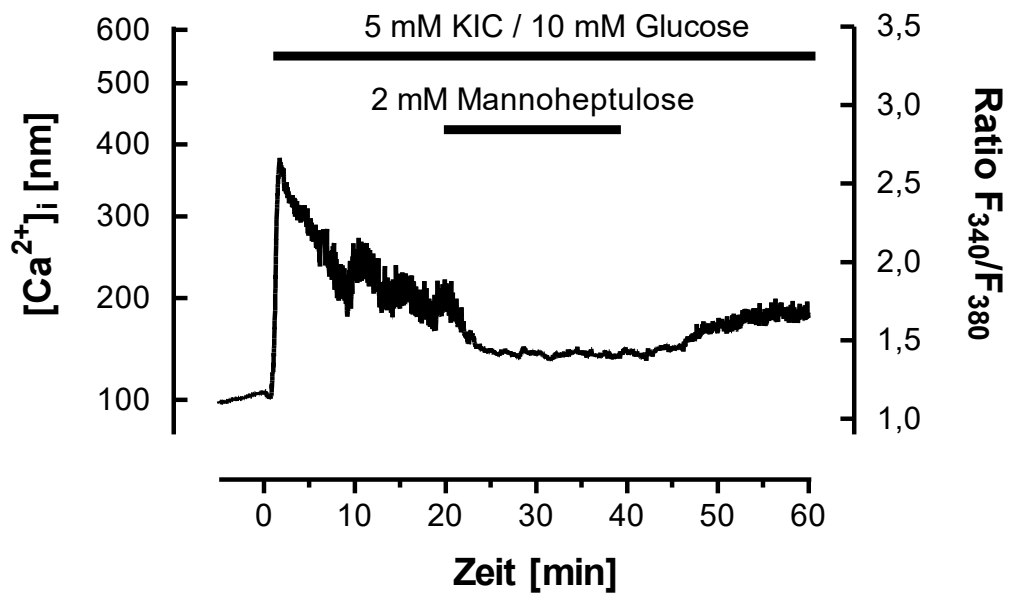


Abb. 31: Einfluß von Mannoheptulose (2 mM) auf die Antwort der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Stimulation mit 10 mM KIC plus 5 mM Glucose.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium (10 mM KIC plus 5 mM Glucose) erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium zusätzlich mit Mannoheptulose (2 mM) versetzt, welche nach weiteren 20 min wieder aus dem Testmedium entfernt wurde. Die Dauer der Stimulation mit KIC (10 mM) plus Glucose (5 mM) bzw. die Zugabe von Mannoheptulose (2 mM) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 3 Versuchen.

---

### **3.1.4.3 Einfluß von Adrenalin auf die Antwort der $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) (5 oder 10 mM) in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen (5 oder 10 mM)**

Untersucht wurde der Einfluß von Adrenalin (100 nM) auf die schnellen  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in isolierten Pankreasinseln nach Stimulation mit KIC plus Glucose. Wie bei der Stimulation mit Glucose allein kam es bei der Stimulation mit KIC plus Glucose unter dem Einfluß von Adrenalin zunächst zu einer initialen Unterdrückung der Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ , die sich dann mit langsamerer Frequenz fortsetzten (Abb. 32 und Abb. 33). Nach Entfernung des Adrenalins aus dem Testmedium stellten sich die ursprünglichen schnellen Oszillationen wieder ein (Abb. 32 und Abb. 33). In Abwesenheit von Glucose hatte Adrenalin keinen Einfluß auf die Antwort der  $[Ca^{2+}]_i$  (nicht dargestellt).

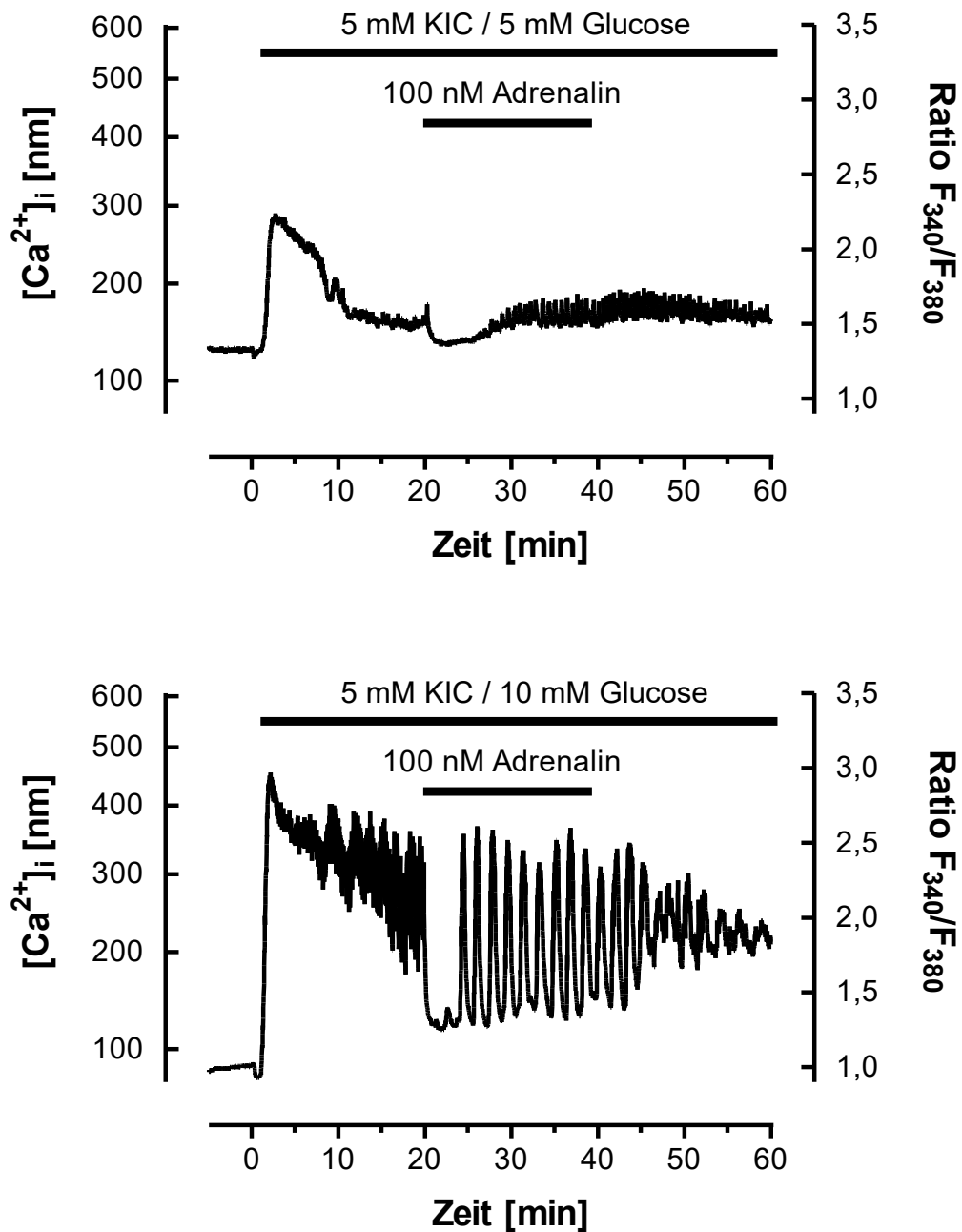


Abb. 32: Einfluß von Adrenalin (100 nM) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Stimulation mit KIC (5 mM) plus Glucose (10 mM).

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium für einen Zeitraum von 20 min zusätzlich mit Adrenalin (100 nM) versetzt. Die Dauer der Stimulation mit KIC (5 mM) plus Glucose (10 mM) bzw. die Zugabe von Adrenalin (100 nM) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 4 Versuchen.

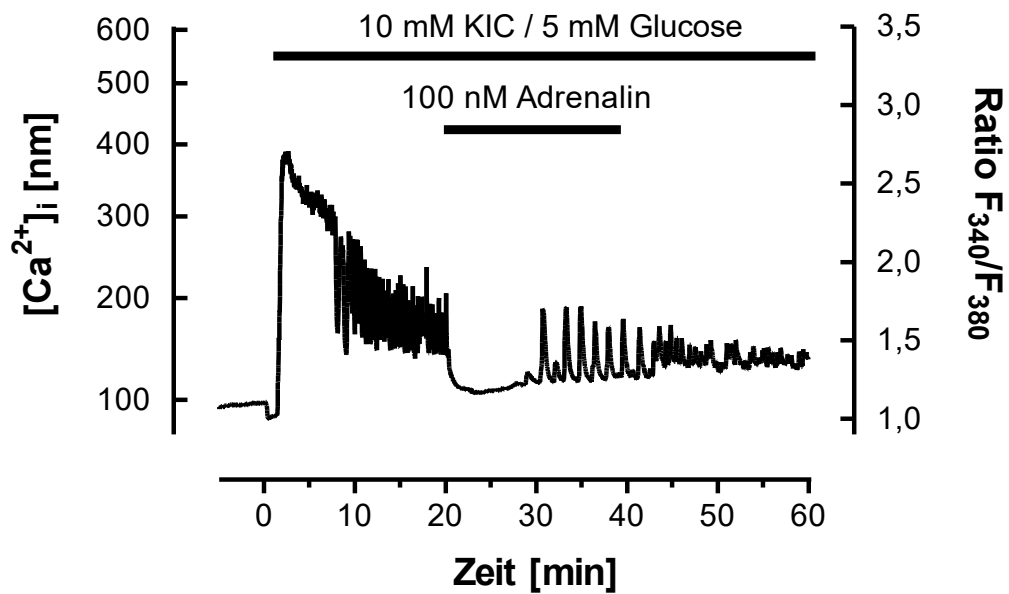


Abb. 33: Einfluß von Adrenalin (100 nM) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Stimulation mit KIC (10 mM) plus Glucose (5 mM).

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium für einen Zeitraum von 20 min zusätzlich mit Adrenalin (100 nM) versetzt. Die Dauer der Stimulation für einen Zeitraum von 20 min zusätzlich mit Adrenalin (100 nM) bzw. die Zugabe von KIC (10 mM) plus Glucose (5 mM) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 3 Versuchen.



### 3.1.4.4 Kombiniertes Einfluß von Adrenalin und Mannoheptulose auf die Antwort der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation mit $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) plus Glucose in Pankreasinseln

Untersucht wurde der Einfluß von Adrenalin (100 nM) und Mannoheptulose (2 mM) auf die schnellen  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in isolierten Pankreasinseln nach Stimulation mit KIC plus Glucose. Wie schon in Kapitel 3.1.1.2 gezeigt, unterdrückte Mannoheptulose die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen des  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln der Maus. Es zeigte sich, daß auch die in Gegenwart von Adrenalin induzierten langsamen Oszillationen des  $[Ca^{2+}]_i$  von Mannoheptulose komplett unterdrückt wurden.

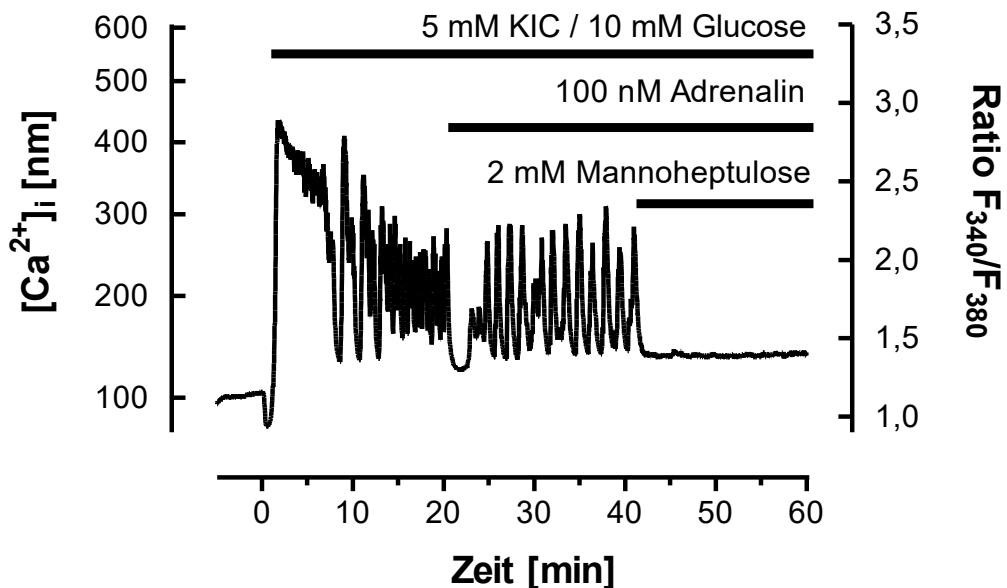


Abb. 34: Einfluß von Adrenalin (100 nM) und Mannoheptulose (2 mM) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus nach einer Stimulation mit KIC (5 mM) plus Glucose (10 mM).

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium für einen Zeitraum von 20 min zusätzlich mit Adrenalin (100 nM) versetzt. Die Dauer der Stimulation mit KIC plus Glucose und die Anwesenheit von Adrenalin (100 nM) bzw. Mannoheptulose (2 mM) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 2 Versuchen.

### **3.1.5 Einfluß von Pyruvat und Methylpyruvat auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von Pyruvat oder Methylpyruvat, dem Methylester der Brenztraubensäure, auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln in einer Konzentration von jeweils 10 mM (Abb. 35). Methylpyruvat, nicht jedoch Pyruvat, induzierte zunächst einen transienten Anstieg, der auf ein gegenüber dem Basalniveau erhöhtes Niveau zurückfiel (Abb. 35). Die Stimulation mit Pyruvat zeigte keine Reaktion der  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 35). Spontane Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  wurden bei keiner der beiden Testsubstanzen beobachtet.

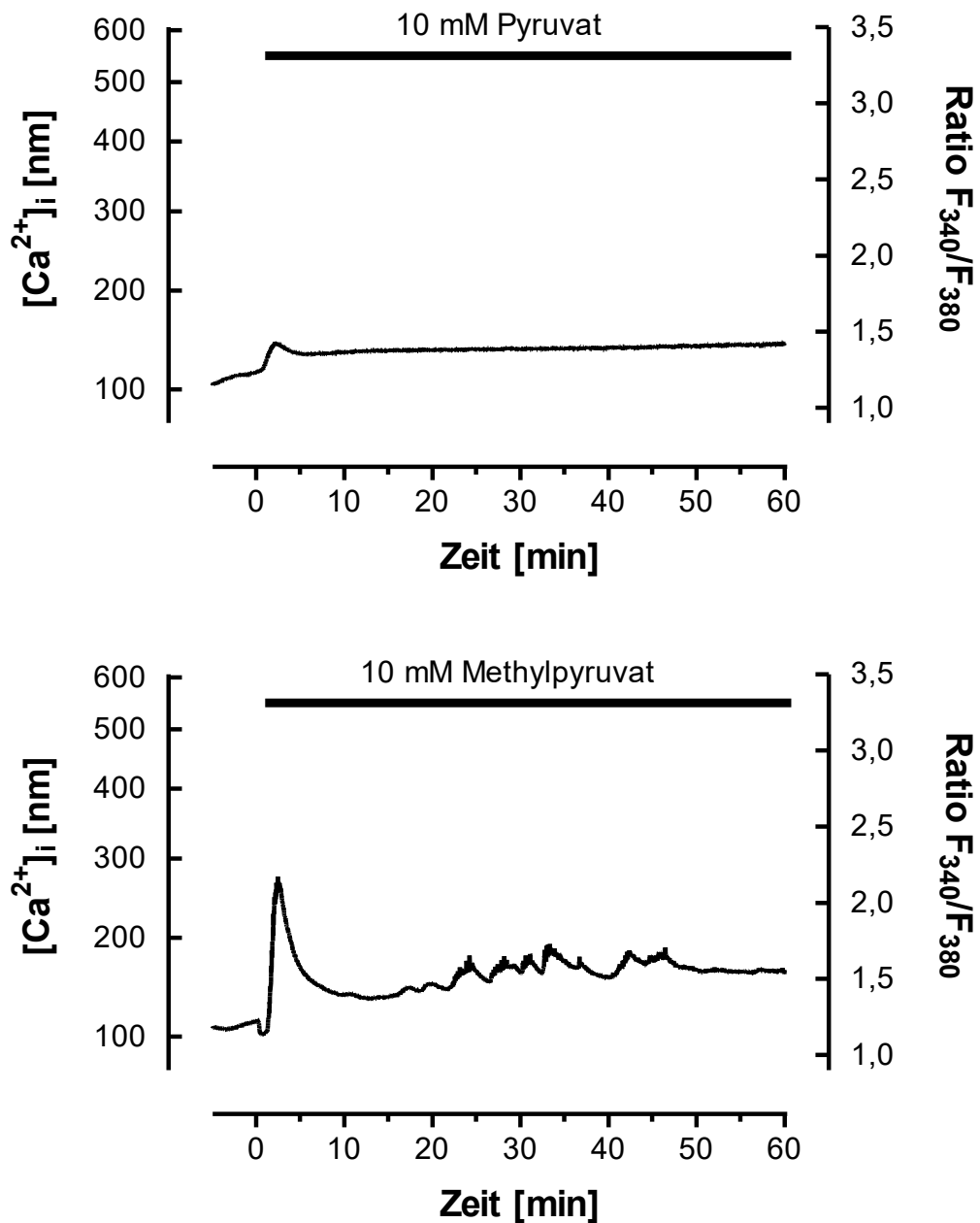


Abb. 35: Einfluß von Pyruvat (10 mM) (oben) und Methylpyruvat (10 mM) (unten) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus.

Der Wechsel vom Basalmedium (ohne Pyruvat) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Pyruvat oder Methylpyruvat (jeweils 10 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus 2 bzw. 3 Versuchen.

---

### **3.1.5.1 Einfluß von Pyruvat (10 mM) und Methylpyruvat (10 mM) plus Glucose auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von Pyruvat und Methylpyruvat auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln in einer Konzentration von jeweils 10 mM plus Glucose (10 mM). Beide Testsubstanzen induzierten zunächst einen transienten Anstieg. Diesem schlossen sich schnelle Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  an (Abb. 36).

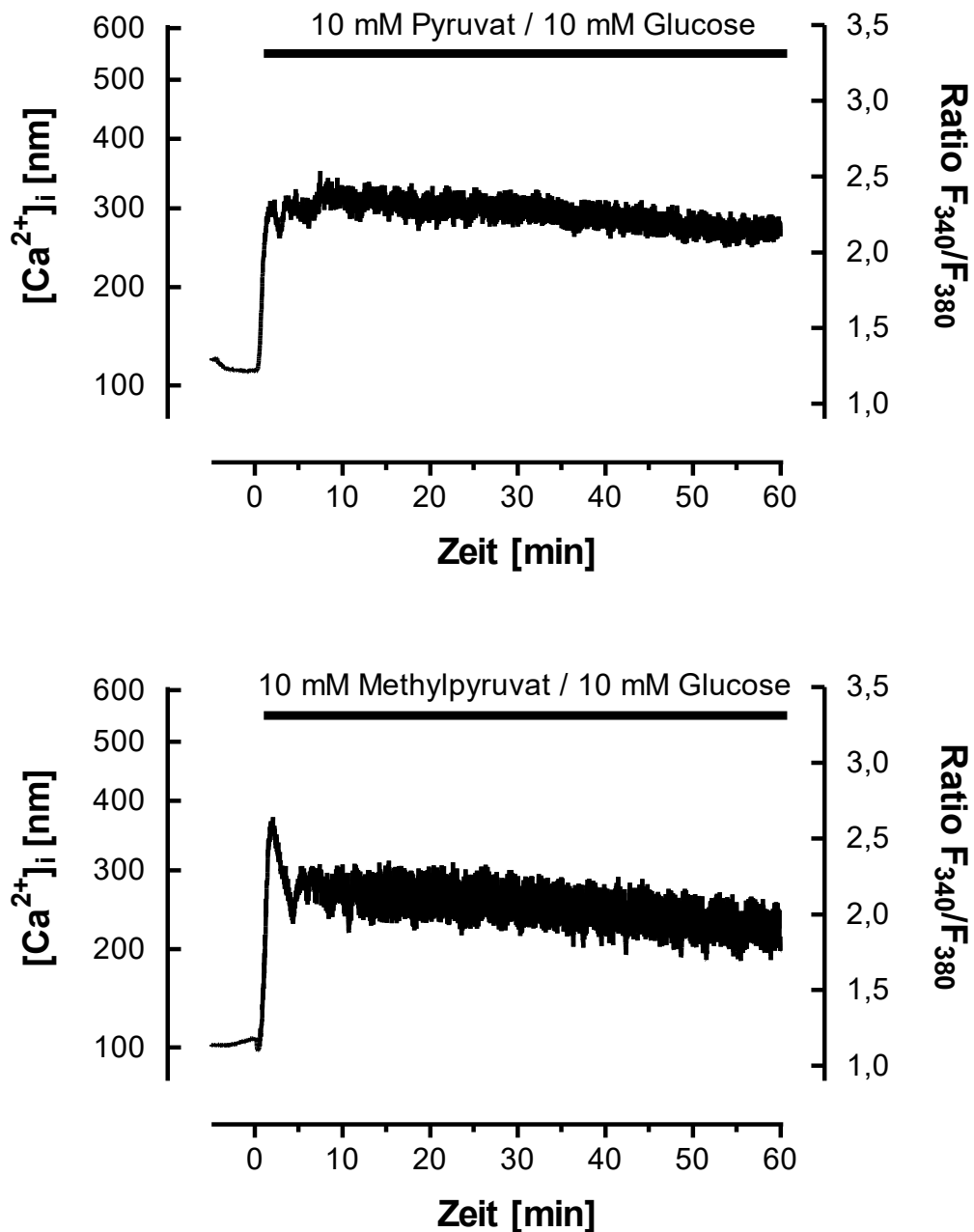


Abb. 36: Einfluß von Pyruvat (10 mM) (oben) und Methylpyruvat (10 mM) (unten) plus Glucose (10 mM) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Pyruvat oder Methylpyruvat (jeweils 10 mM) plus Glucose (10 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus jeweils 4 Versuchen.

### 3.1.6 Einfluß von Tolbutamid auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln

Untersucht wurde der Einfluß von Tolbutamid, einem blutzuckersenkenden Sulfonylharnstoffderivat, auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln (Abb. 37). Tolbutamid schließt den ATP-abhängigen Kaliumkanal ( $K_{ATP}$ ) KIR 6.2 durch Bindung an den mit diesem Kanal assoziierten Sulfonylharnstoffrezeptor SUR1 und stimuliert dadurch die Insulinsekretion. Tolbutamid (200  $\mu$ M) induzierte zunächst einen transienten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , dem sich sehr langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  anschlossen (Abb. 37).

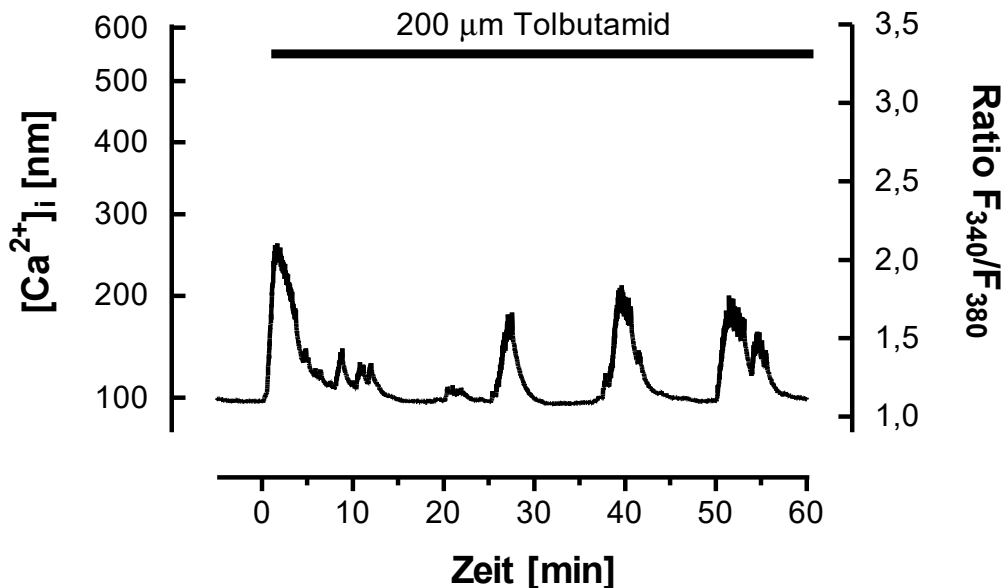


Abb. 37: Einfluß von Tolbutamid (200  $\mu$ M) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (ohne Tolbutamid) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Tolbutamid (200  $\mu$ M) ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 4 Versuchen.

---

### **3.1.6.1 Einfluß von Tolbutamid (200 $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen (5-20 mM) auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von Tolbutamid auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  plus Glucose (5-20 mM). Tolbutamid induzierte plus Glucose zunächst einen kurzzeitigen leichten Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , dem ein transienter Anstieg folgte. Diesem schlossen sich spontane langsame Oszillationen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit großer Amplitude an (Abb. 38 und Abb. 39). Plateaus und Täler dieser Oszillationen wiesen die gleiche Breite auf.

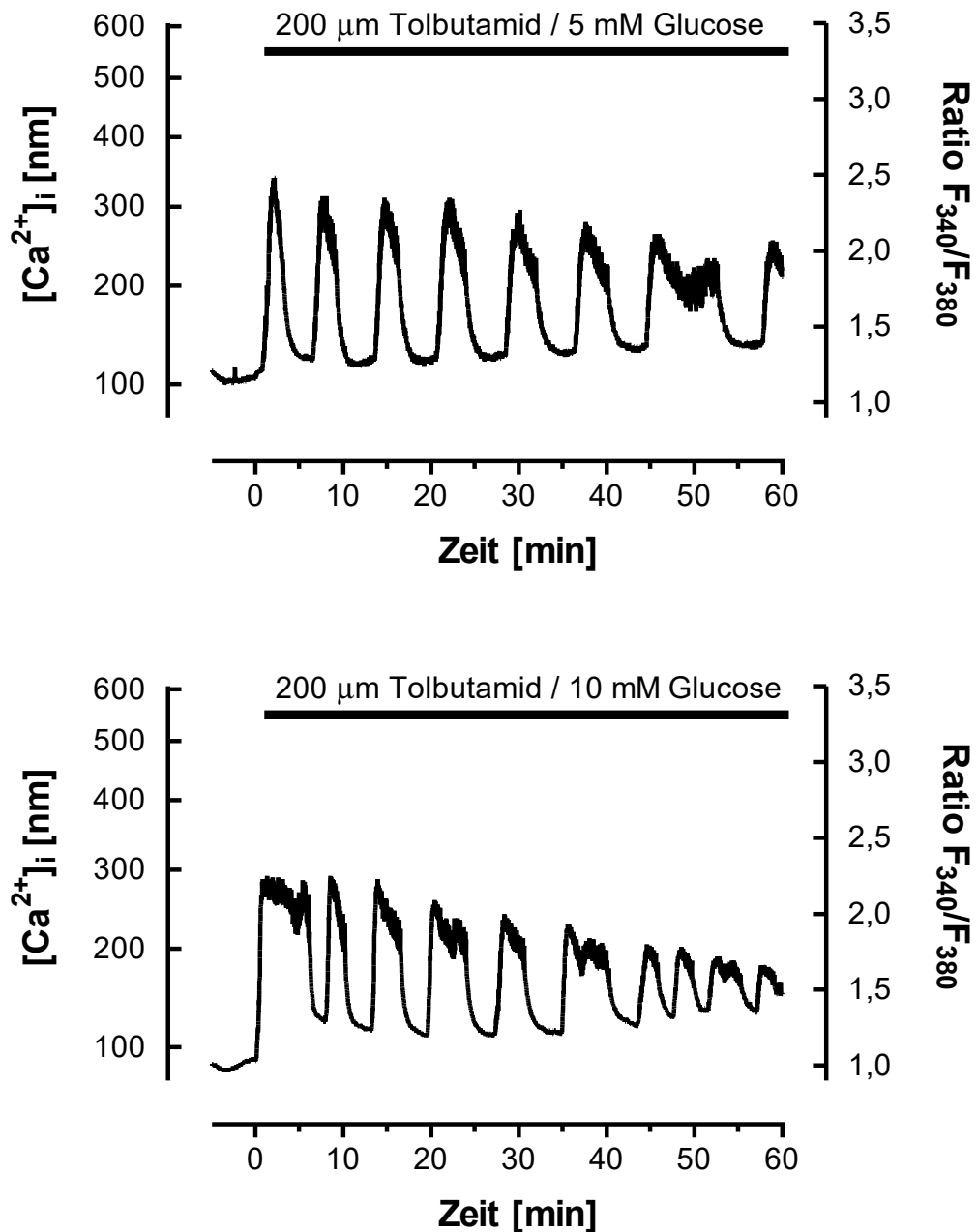


Abb. 38: Einfluß von Tolbutamid (200  $\mu$ M) plus 5 mM (oben) und 10 mM Glucose (unten) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Tolbutamid (200  $\mu$ M) plus Glucose (5 oder 10 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus 3 bzw. 6 Versuchen.



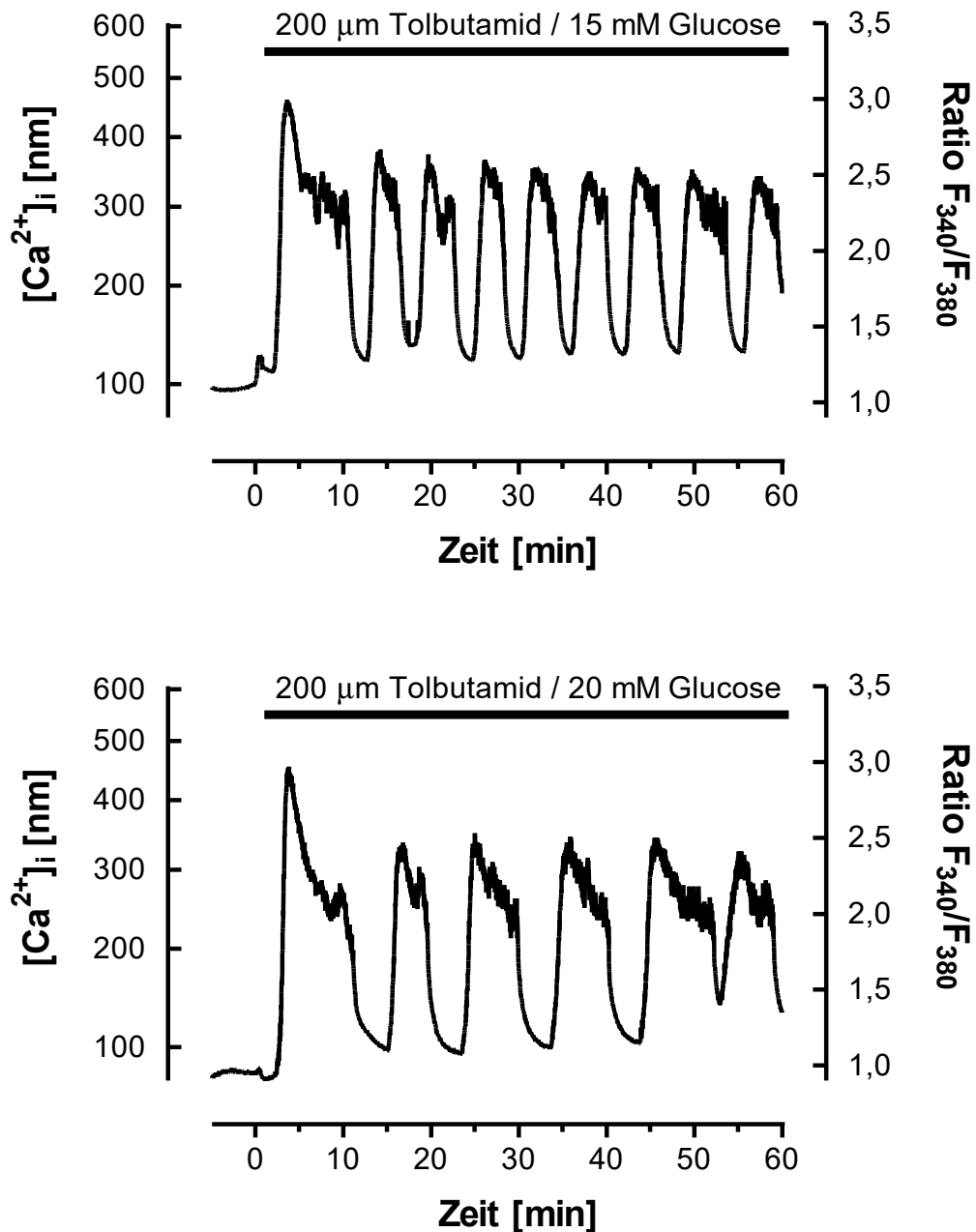


Abb. 39: Einfluß von Tolbutamid (200 μM) plus 15 mM (oben) und 20 mM (unten) Glucose auf die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Tolbutamid (200 μM) plus Glucose (15 oder 20 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus 3 bzw. 6 Versuchen.

### 3.1.6.2 Abhängigkeit der Frequenz der in Gegenwart von Tolbutamid von Glucose induzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ und der mittleren $[Ca^{2+}]_i$ von der Glucosekonzentration

Bei der Stimulation von isolierten Pankreasinseln der Maus mit Glucose in Anwesenheit von Tolbutamid ergab sich im Konzentrationsbereich zwischen 5 und 20 mM keine Änderung der Oszillationen des  $[Ca^{2+}]_i$ . Die Frequenz war jedoch jeweils signifikant niedriger, als die, der in Abwesenheit von Tolbutamid induzierten Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  (10-20 mM) (). Das Muster der Oszillationen blieb unverändert.

Tabelle 8: Abhängigkeit der Frequenz der von Glucose in Gegenwart von Tolbutamid induzierten langsamen Oszillationen  $[Ca^{2+}]_i$  von der Glucosekonzentration in Pankreasinseln.

Glucose-konzentration [mM]	Frequenz [ $\text{min}^{-1}$ ]
0	0,09 ± 0,01 (4)
5	0,17 ± 0,03 (5)
10	0,22 ± 0,02 (5)
15	0,14 ± 0,02 (4)
20	0,14 ± 0,03 (3)

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

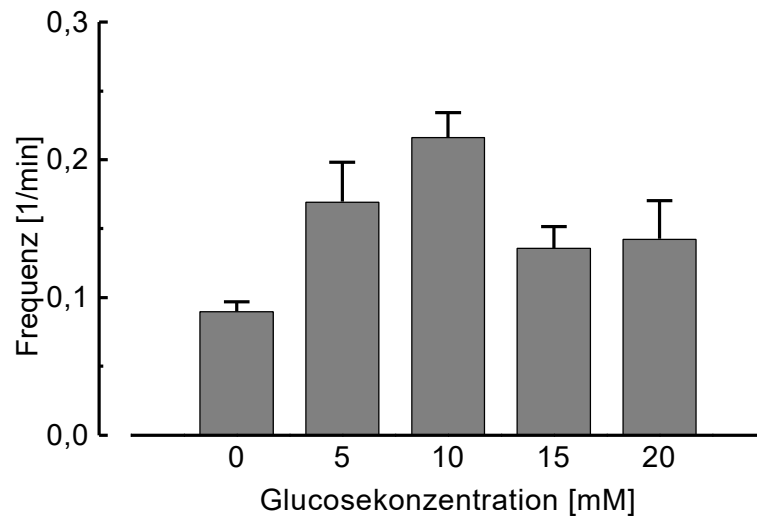


Abb. 40: Abhängigkeit der Frequenz der von Glucose in Gegenwart von Tolbutamid induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  von der Glucosekonzentration in Pankreasinseln.

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationsfrequenzen, die sich aus Tabelle 8 ergeben. Die Konzentrationsabhängigkeit der Frequenz ist nicht signifikant.

Tabelle 9: Abhängigkeit der mittleren Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  in Gegenwart von Tolbutamid von der Glucosekonzentration in Pankreasinseln.

Glucose- konzentration [mM ]	Änderung der mittleren $[Ca^{2+}]_i$ [nM]
0	$49 \pm 19$ (4)
5	$63 \pm 9$ (4)
10	$69 \pm 10$ (5)
15	$100 \pm 12$ (4)
20	$102 \pm 5$ (3)

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

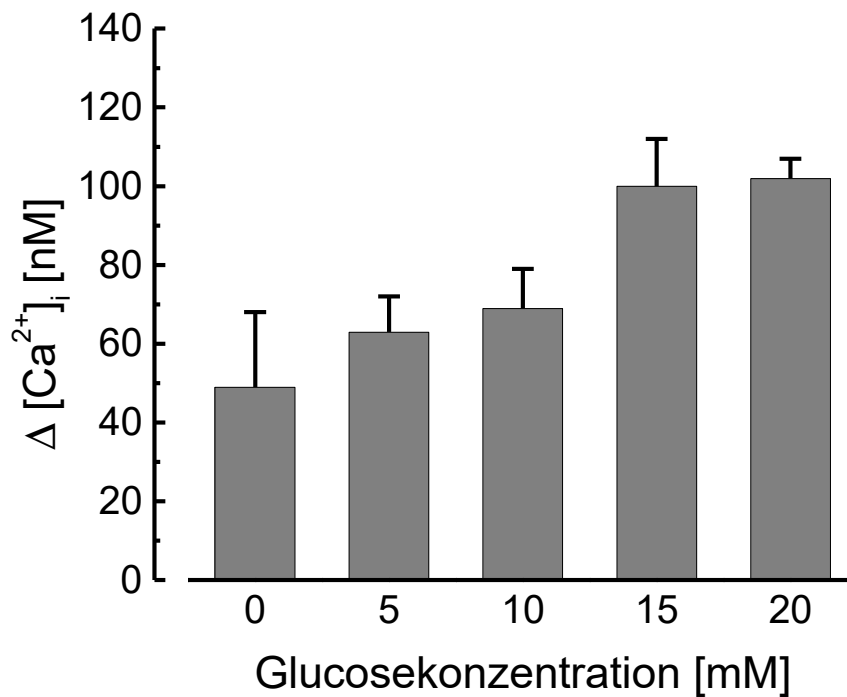


Abb. 41: Abhängigkeit der mittleren Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  in Gegenwart von Tolbutamid von der Glucosekonzentration in Pankreasinseln.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationsfrequenzen, die sich aus Tabelle 9 ergeben.

Die Änderung der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  ist nicht signifikant.

---

### **3.1.6.3 Einfluß von Mannoheptulose auf die langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit Tolbutamid (200 $\mu$ M) plus Glucose**

Untersucht wurde der Einfluß von Mannoheptulose (2 mM), einem Inhibitor der glucoseinduzierten Insulinsekretion und der Glucokinase, auf die langsamen Oszillationen  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln nach Stimulation mit Glucose plus Tolbutamid. Wie in Kapitel 3.1.1.2 gezeigt, unterdrückte Mannoheptulose die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ . Im Gegensatz zu den allein durch Substrate induzierten Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  wurden diese durch Glucose plus Tolbutamid induzierten Oszillationen zwar auch weitestgehend beseitigt, jedoch sank die  $[Ca^{2+}]_i$  nicht auf das untere Basalniveau der Oszillationen, sondern stieg überraschenderweise auf das obere Niveau an (Abb. 42 und Abb. 43).

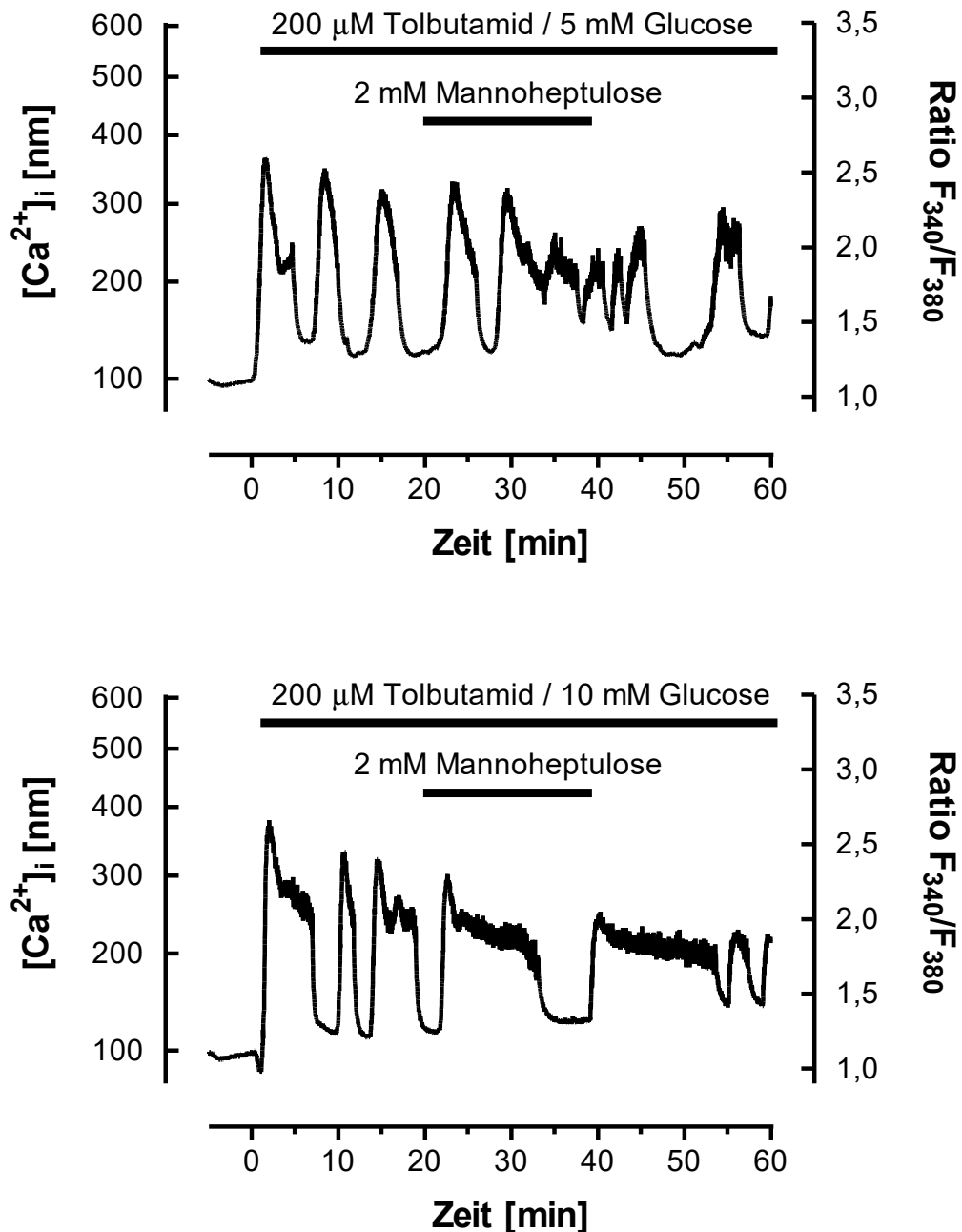


Abb. 42: Einfluß von Mannoheptulose auf die langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln nach Stimulation mit Tolbutamid (200  $\mu$ M) plus 5 mM (oben) bzw. 10 mM Glucose (unten).

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose, ohne Tolbutamid) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium zusätzlich mit Mannoheptulose (2 mM) versetzt, welche nach weiteren 20 min wieder aus dem Testmedium entfernt wurde. Die Dauer der Stimulation mit Tolbutamid (200  $\mu$ M) plus Glucose (5 oder 10 mM) und die Zugabe von Mannoheptulose (2 mM) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus 5 bzw. 4 Versuchen.

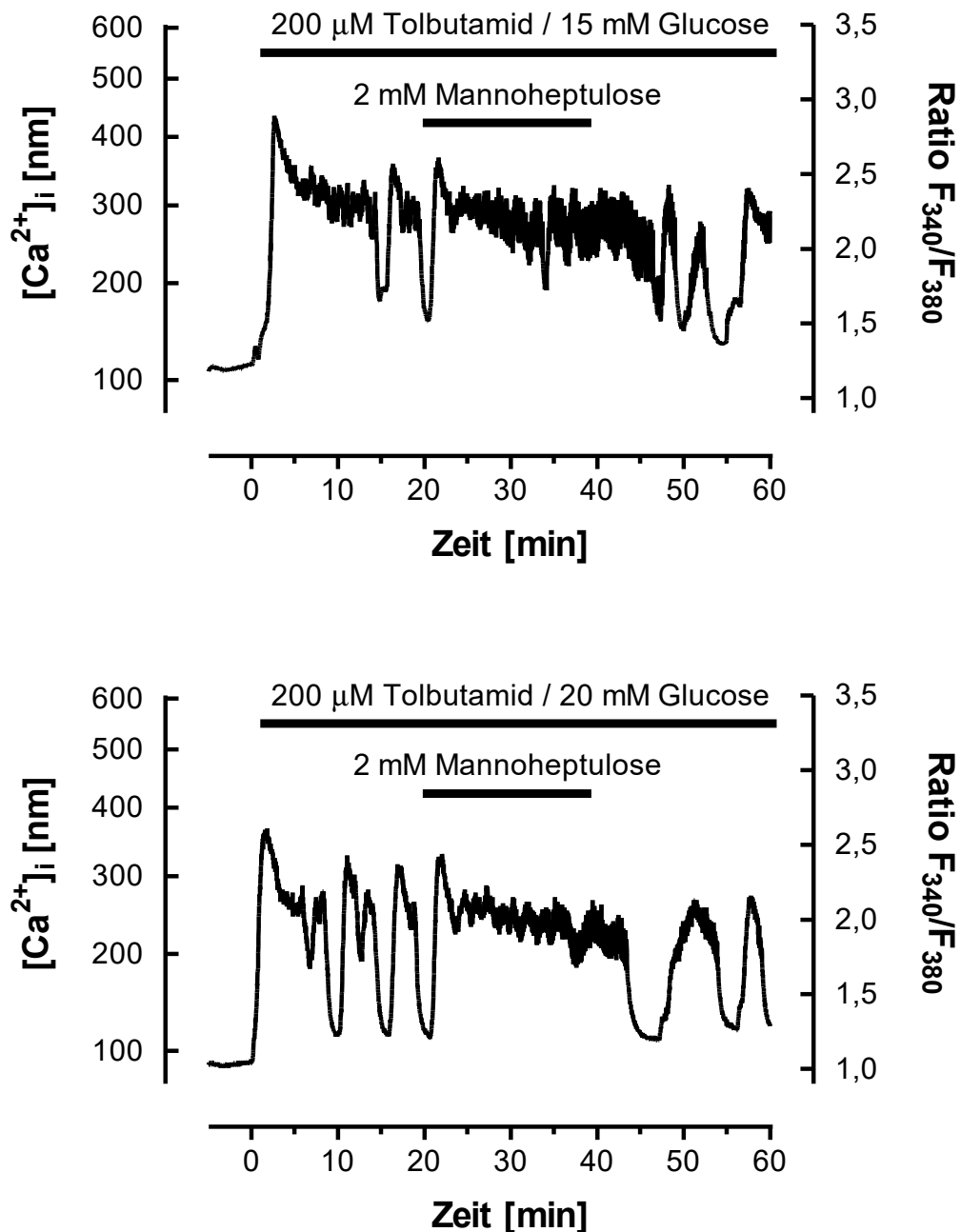


Abb. 43: Einfluß von Mannoheptulose auf die langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln nach einer Stimulation mit Tolbutamid (200  $\mu$ M) plus 15 mM (oben) oder 20 mM Glucose (unten).

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Nach einer 20-minütigen Stimulation wurde das Testmedium zusätzlich mit Mannoheptulose (2 mM) versetzt, welche nach weiteren 20 min wieder aus dem Testmedium entfernt wurde. Die Dauer der Stimulation mit Tolbutamid (200  $\mu$ M) plus Glucose (15 oder 20 mM) und die Zugabe von Mannoheptulose (2 mM) sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus jeweils 5 Versuchen.

### 3.1.6.4 Einfluß einer hohen Tolbutamidkonzentration (800 $\mu\text{M}$ ) auf die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Pankreasinseln

Untersucht wurde in diesem Versuch der Einfluß einer hohen Tolbutamidkonzentration (800  $\mu\text{M}$ ) plus Glucose (15 mM) auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln (Abb. 39). Nach einer Vorperfusion mit glucosefreiem Medium wurde zunächst einen Peak der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induziert, der sodann wieder auf das Basalniveau zurückfiel. Erst darauf folgte ein zweiter transientser Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , dem sich dann langsame Oszillationen anschlossen (Abb. 39). Nach einer Vorperfusion mit glucosehaltigem (5 mM) Medium wurde der initiale Peak der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nicht beobachtet (nicht dargestellt).

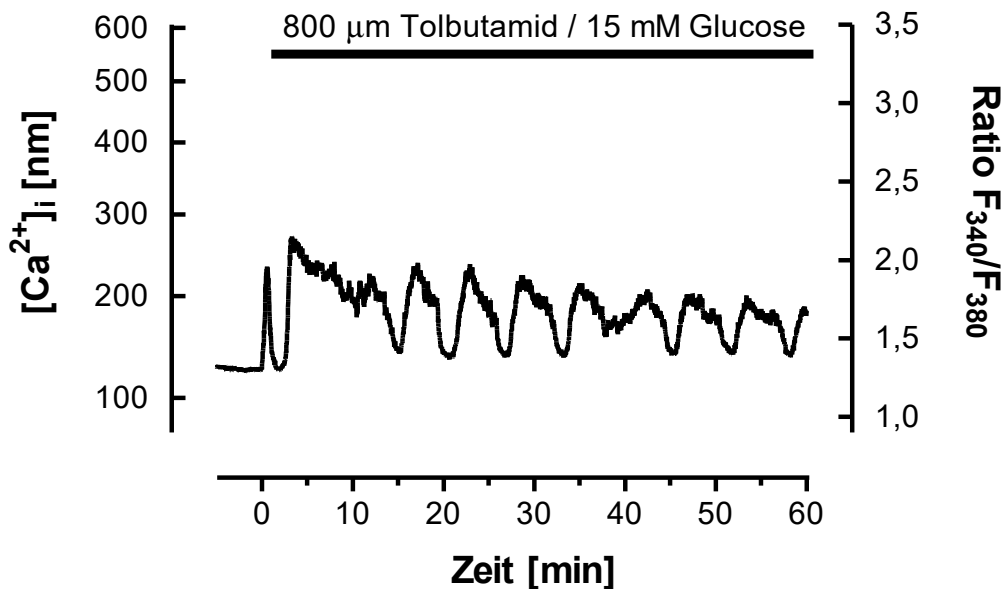


Abb. 44: Einfluß von Tolbutamid (800  $\mu\text{M}$ ) plus Glucose (15 mM) auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (ohne Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Tolbutamid (800  $\mu\text{M}$ ) plus Glucose (15 mM) ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 4 Versuchen.

---

### **3.1.6.5 Einfluß von Tolbutamid (200 $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von Tolbutamid (200  $\mu\text{M}$ ) auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln plus KIC (1 oder 5 mM). Nach dem Mediumwechsel kam es zu einem Anstieg, dem sich schnelle Oszillationen auf erhöhtem Niveau anschlossen (Abb. 45). Langsame Oszillationen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurden bei keiner der beiden von KIC-konzentrationen beobachtet.



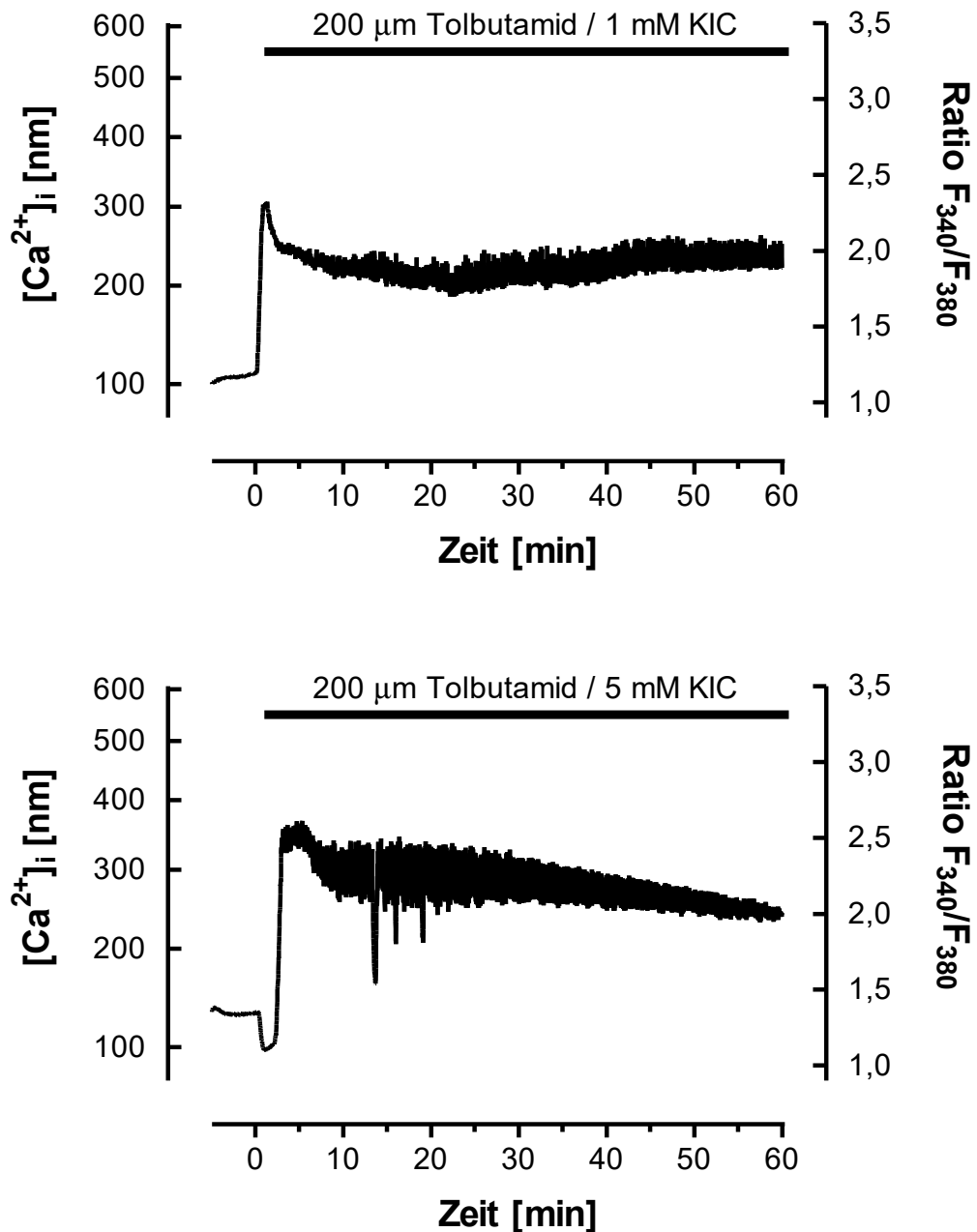


Abb. 45: Einfluß von Tolbutamid (200  $\mu$ M) plus 1 mM (oben) und 5 mM  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC) (unten) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (ohne Zusatz) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit KIC (1 oder 5 mM) plus Tolbutamid (200  $\mu$ M) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus 3 Versuchen.

### 3.1.7 Einfluß von N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln

Untersucht wurde der Einfluß von NBDP (200  $\mu$ M) auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln (Abb. 35). NBDP stimuliert ebenso wie Tolbutamid die Insulinsekretion. NBDP induzierte zunächst einen transienten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , dem sich sehr langsame Oszillationen anschlossen (Abb. 46).

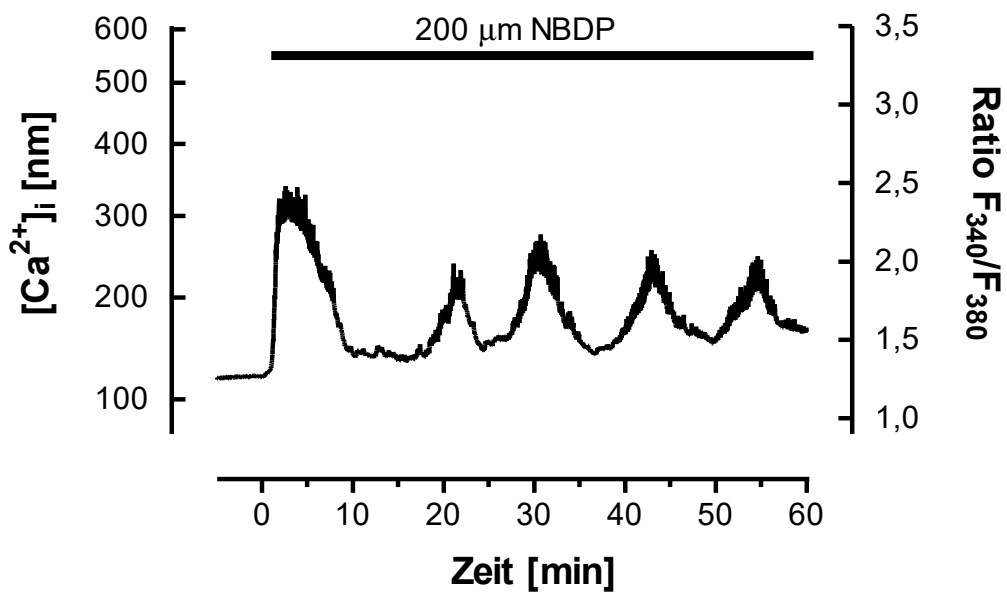


Abb. 46: Einfluß von NBDP (200  $\mu$ M) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (ohne NBDP) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit NBDP (200  $\mu$ M) ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 4 Versuchen.

---

### **3.1.7.1 Einfluß von N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP) (200 µM) in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen (5-20 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von NBDP (200 µM) auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln plus Glucose (5-20 mM). NBDP induzierte plus Glucose zunächst einen transienten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Diesem schlossen sich spontane langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  mit großer Amplitude an. Die Plateaus dieser Oszillationen wiesen eine größere Breite auf als die Täler (Abb. 47 und Abb. 48).

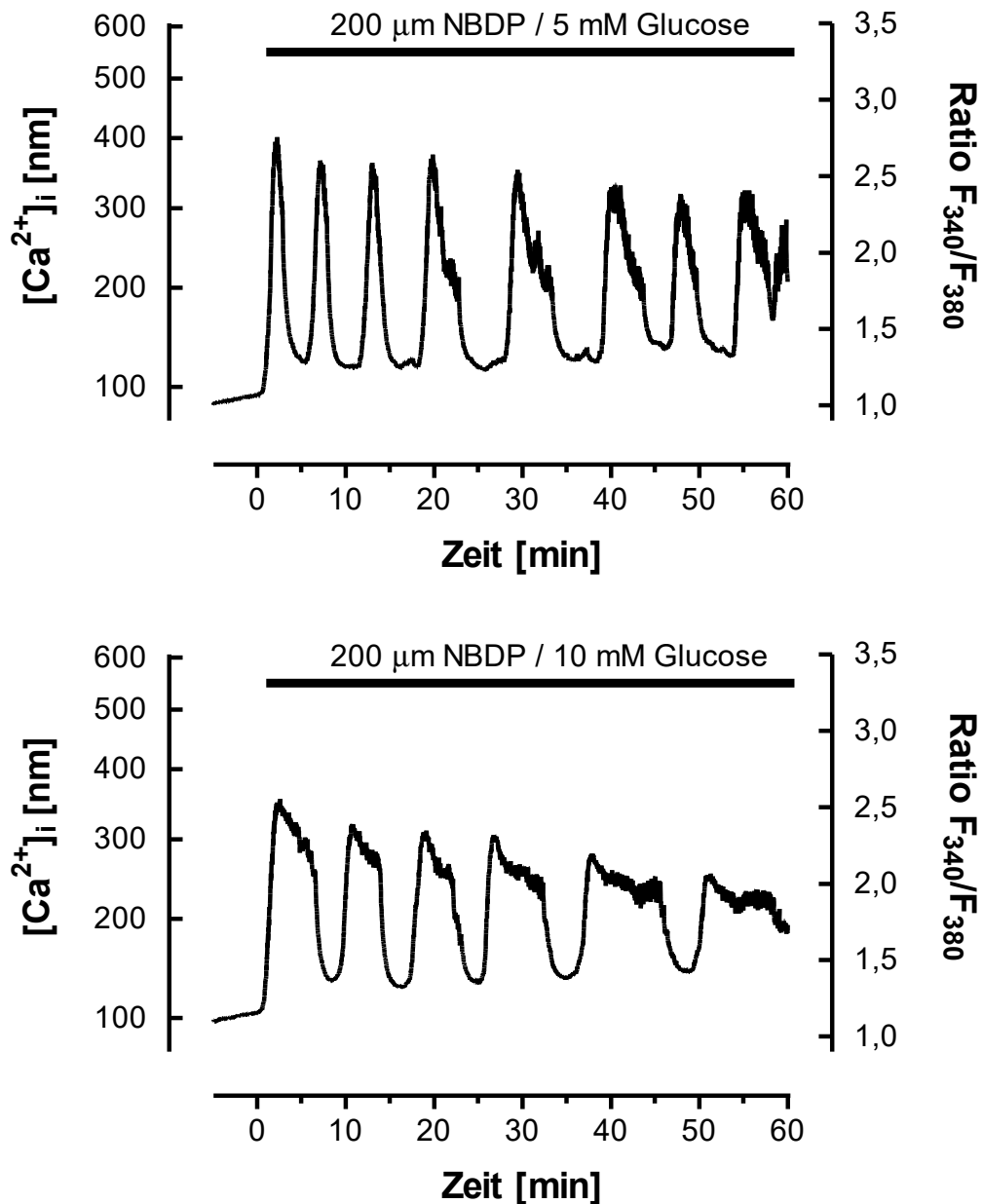


Abb. 47: Einfluß von NBDP (200  $\mu$ M) plus 5 mM (oben) und 10 mM Glucose (unten) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (5mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit NBDP (200  $\mu$ M) plus Glucose (5 und 10 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus jeweils 5 Versuchen.

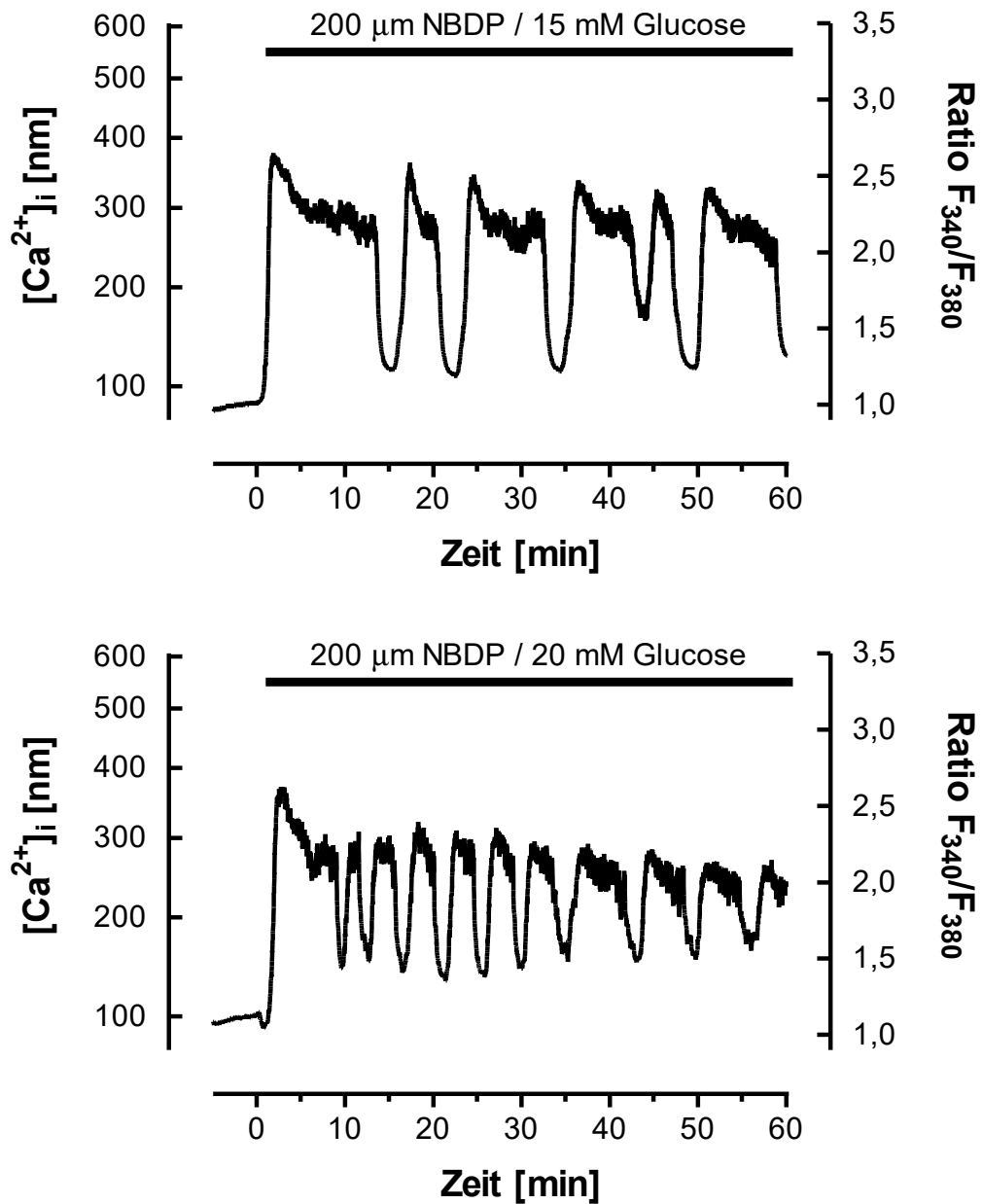


Abb. 48: Einfluß von NBDP (200 µM) plus 15 mM (oben) und 20 mM (unten) Glucose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit NBDP (200 µM) plus Glucose (15 und 20 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus 5 bzw. 6 Versuchen.

### 3.1.7.2 Abhängigkeit der Frequenz der von N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP) plus Glucose induzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln von der Glucosekonzentration

Bei der Stimulation von isolierten Pankreasinseln der Maus mit Tolbutamid allein oder in Anwesenheit von Glucose ergab sich im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 5 mM eine Konzentrationsabhängigkeit der Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ . Eine weitere Erhöhung der Glucosekonzentration ergab keine weitere Änderung der Oszillationsfrequenz. Außer der Oszillationsfrequenz änderte sich bei der Anwesenheit von Glucose das Oszillationsmuster. NBDP allein induzierte langsame Oszillationen mit einem langsamen Anstieg und Abfall, während sich in Gegenwart von Glucose schnelle Anstiege und Abfälle der  $[Ca^{2+}]_i$  ergaben.

*Tabelle 10: Abhängigkeit der Frequenz der von NBDP plus Glucose induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln von der Glucosekonzentration.*

Glucose- konzentration [mM ]	Frequenz [min <sup>-1</sup> ] (Anzahl der Versuche)
0	0,09 ± 0,01 (4)
5	0,15 ± 0,04 (5)
10	0,16 ± 0,04 (5)
15	0,18 ± 0,03 (5)
20	0,14 ± 0,02 (6)

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

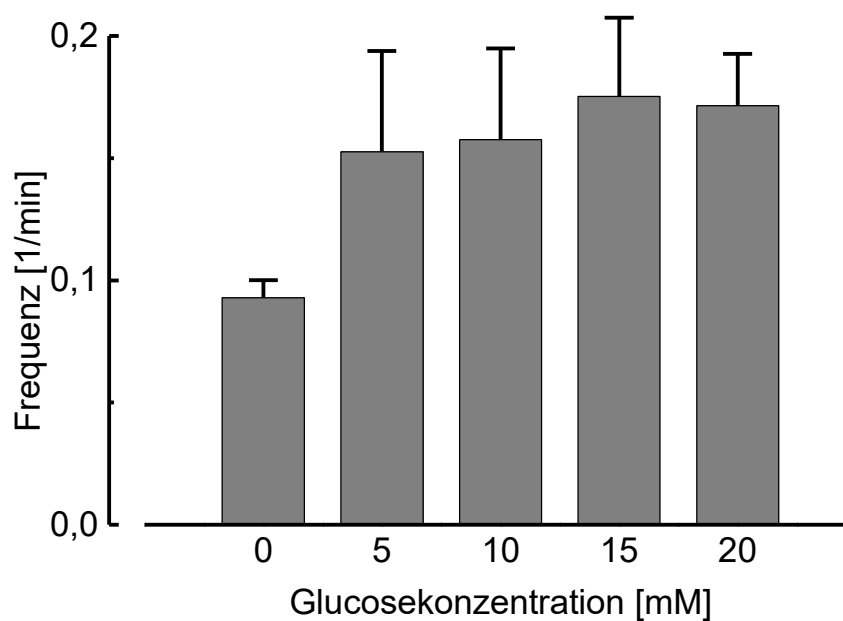


Abb. 49: Abhängigkeit der Frequenz der von NBDP plus Glucose induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln von der Glucosekonzentration.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationsfrequenzen, die sich aus Tabelle 8 ergeben. Die Konzentrationsabhängigkeit der Frequenz ist nicht signifikant.

### 3.1.7.3 Abhängigkeit der mittleren Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln nach Stimulation mit N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP) von der Glucosekonzentration

Tabelle 11: Abhängigkeit der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln nach Stimulation mit NBDP in Gegenwart steigender Glucosekonzentrationen von der Glucosekonzentration.

Glucosekonzentration [mM]	Änderung der mittleren $[Ca^{2+}]_i$ [nM]
0	$41 \pm 6$ (4)
5	$73 \pm 11$ (5)
10	$68 \pm 14$ (5)
15	$82 \pm 12$ (5)
20	$89 \pm 4$ (6)

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

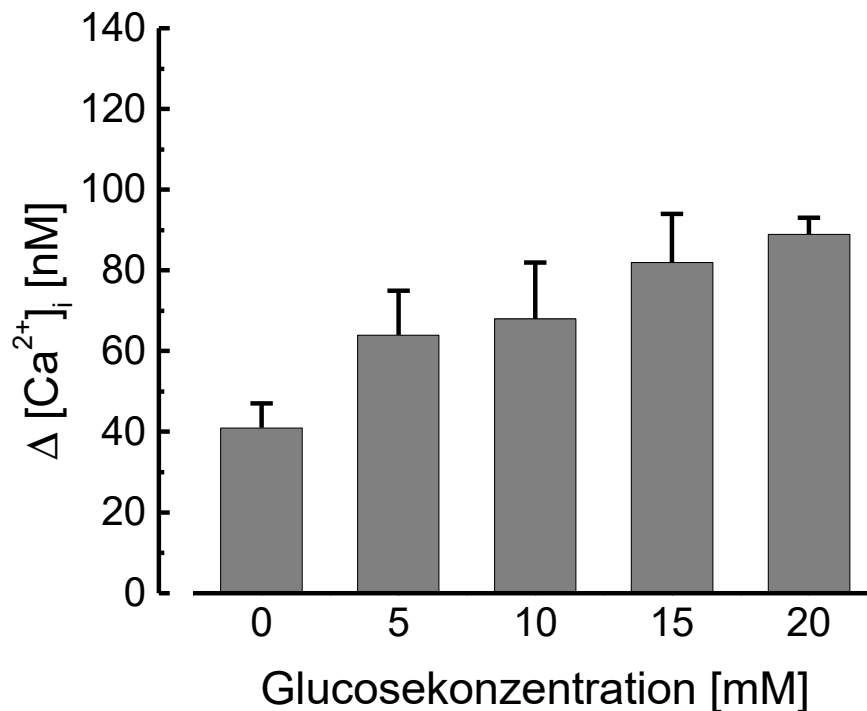


Abb. 50: Abhängigkeit der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln nach Stimulation mit NBDP in Gegenwart steigender Glucosekonzentrationen von der Glucosekonzentration.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationsfrequenzen, die sich aus Tabelle 9 ergeben.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Änderung der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  ist nicht signifikant



### 3.1.7.4 Einfluß einer hohen N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP)-Konzentration (800 $\mu\text{M}$ ) plus Glucose (15 mM) auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Pankreasinseln

Untersucht wurde der Einfluß einer hohen NBDP-Konzentration (800  $\mu\text{M}$ ) plus Glucose (15 mM) auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln (Abb. 39). Nach einer Vorperifusion mit glucosefreiem Medium induzierte NBDP zunächst einen kurzen Peak der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , die anschließend nahezu auf das Basalniveau zurückfiel. Darauf folgte ein transients Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , dem sich langsame Oszillationen anschlossen (Abb. 39). Nach einer Vorperifusion mit 5 mM glucosehaltigem Medium wurde der initiale Peak der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nicht beobachtet (nicht dargestellt)

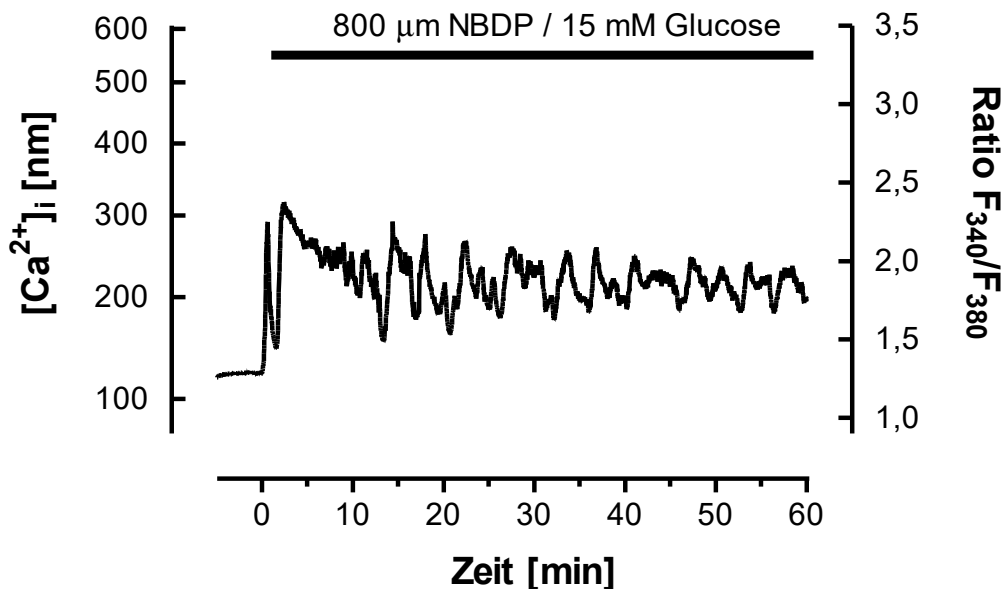


Abb. 51: Einfluß von NBDP (800  $\mu\text{M}$ ) plus Glucose (15 mM) auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (ohne Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit NBDP (800  $\mu\text{M}$ ) plus Glucose (15 mM) ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 4 Versuchen.

### 3.1.8 Einfluß von Antazolin auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln

Untersucht wurde der Einfluß von Antazolin, einem Imidazolinderivat, auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln in einer Konzentration von 25 oder 50  $\mu\text{M}$  (Abb. 46). Antazolin stimuliert die Insulinsekretion durch einen bisher nicht bekannten Mechanismus. Antazolin induzierte bei 50  $\mu\text{M}$  (jedoch nicht bei 25  $\mu\text{M}$ , nicht dargestellt) zunächst einen langsamen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Dieser Anstieg begann nach 5 min und erreichte nach 15 min wieder ein leicht erhöhtes Basalniveau (Abb. 52). Spontane Oszillationen wurden bei keiner der getesteten Konzentrationen beobachtet.

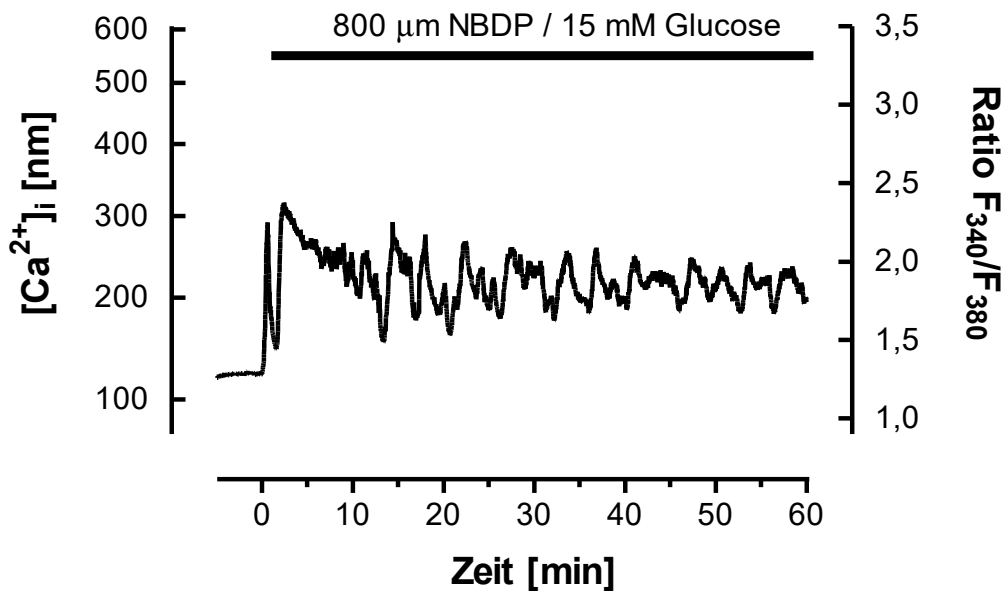


Abb. 52: Einfluß von Antazolin auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln nach Zusatz von Antazolin (50  $\mu\text{M}$ ).

Der Wechsel vom Basalmedium (ohne Antazolin) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Antazolin (50  $\mu\text{M}$ ) ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurven aus 3 Versuchen.

---

### **3.1.8.1 Einfluß von Antazolin (25 $\mu\text{M}$ ) in Gegenwart verschiedener Glucosekonzentrationen (10 oder 20 mM) auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von Antazolin (25  $\mu\text{M}$ ) plus Glucose (10 oder 20 mM) auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln. Die niedrige Antazolinkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  wurde gewählt, da bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  die in Gegenwart von Glucose induzierten Oszillationen nach ca. 30 min verschwanden. Antazolin induzierte in Gegenwart von Glucose zunächst einen kurzzeitigen leichten Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , dem ein transients Anstieg folgte. Diesem schlossen sich spontane langsame Oszillationen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit großer Amplitude an. Plateaus und Täler dieser Oszillationen wiesen die gleiche Breite auf (Abb. 47).

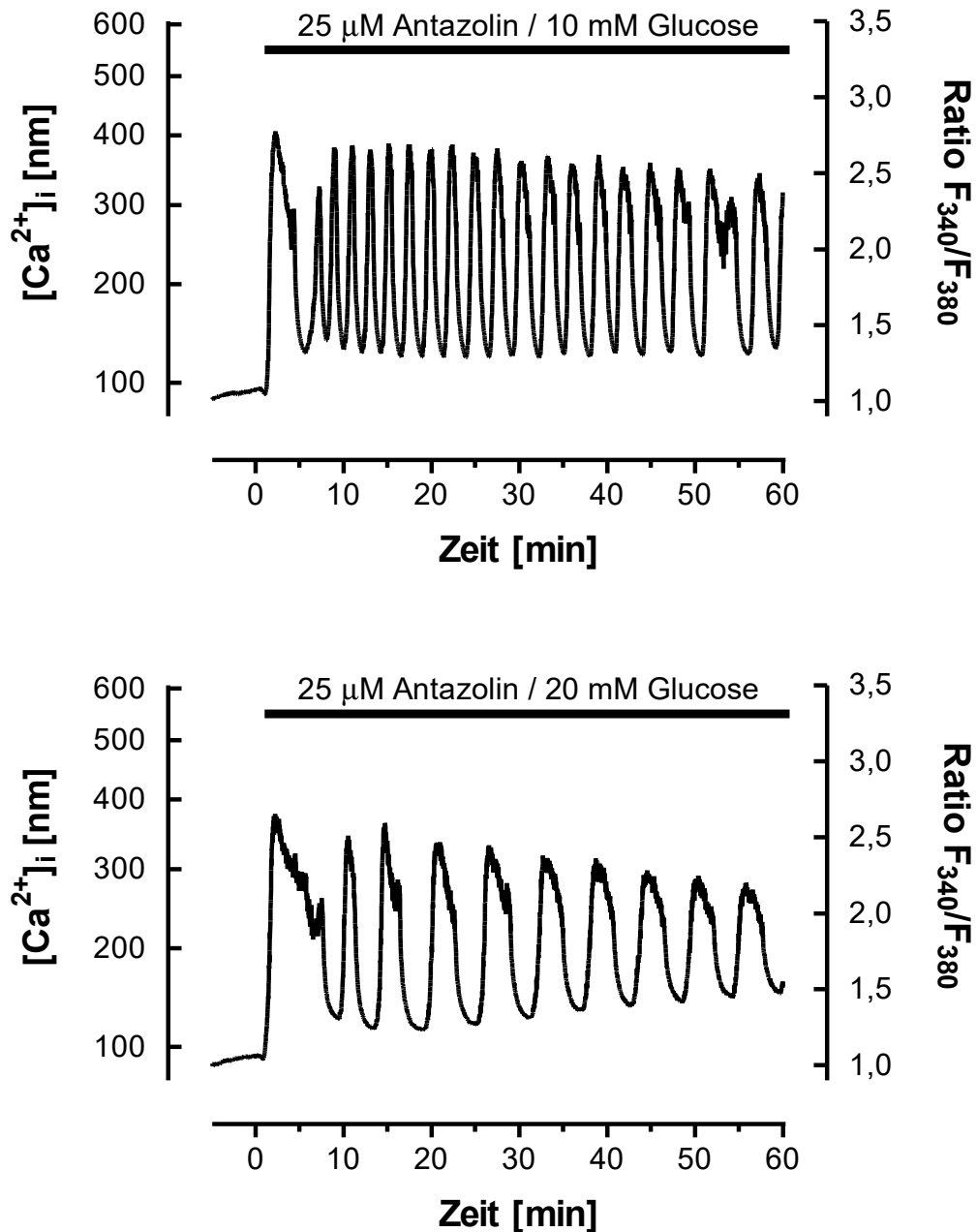


Abb. 53: Einfluß von Antazolin (25 µM) plus 10 mM (oben) und 20 mM Glucose (unten) auf die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Antazolin (25 µM) plus Glucose (10 oder 20 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus 8 bzw. 3 Versuchen.

### 3.1.8.2 Abhängigkeit der Frequenz der von Antazolin plus Glucose induzierten langsamen Oszillationen $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln von der Glucosekonzentration

Bei der Stimulation von isolierten Pankreasinseln der Maus mit Antazolin plus Glucose ergab sich im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 20 mM eine Konzentrationsabhängigkeit der Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ . In diesem Bereich kam es nahezu zu einer Halbierung der Oszillationsfrequenz von  $0,31 \text{ min}^{-1}$  auf  $0,17 \text{ min}^{-1}$ .

Tabelle 12: Abhängigkeit der Frequenz der von Antazolin induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln von der Glucosekonzentration.

Glucosekonzentration [mM]	Frequenz [1 min <sup>-1</sup> ] (Anzahl der Versuche)
10	$0,31 \pm 0,01$ (8)
20	$0,17 \pm 0,01$ (3)

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

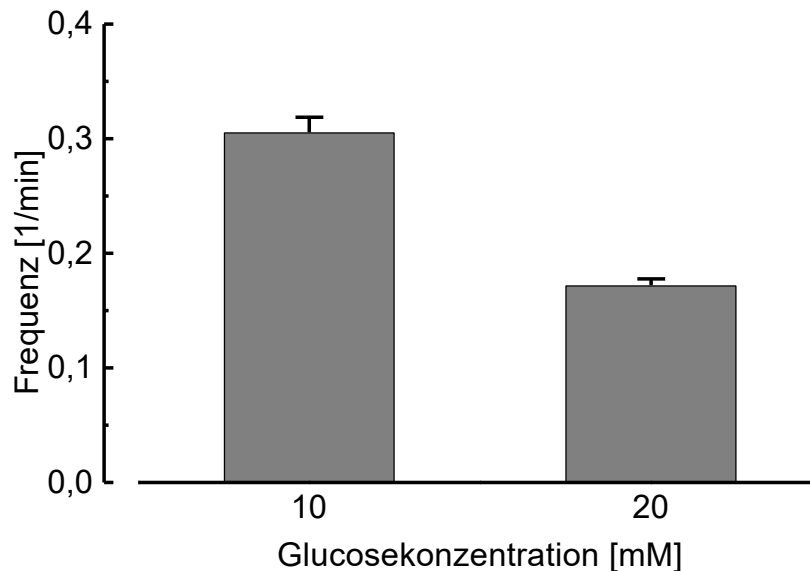


Abb. 54: Abhängigkeit der Frequenz der von Antazolin induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln von der Glucosekonzentration.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationsfrequenzen, die sich aus Tabelle 10 ergebende. Die Änderungen der Frequenz bei einer Glucosekonzentration von 10 auf 20 mM ist signifikant ( $p < 0,01$ ).

### 3.1.9 Einfluß von Carbamylcholin auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln

Untersucht wurde der Einfluß von Carbamylcholin auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in Pankreasinseln in einer Konzentration von 50  $\mu M$  (Abb. 55). Nach dem Mediumwechsel kam es bei der Stimulation mit Carbamylcholin zu einem kurzen Peak der  $[Ca^{2+}]_i$ , die anschließend wieder auf das Basalniveau zurückfiel (Abb. 55).

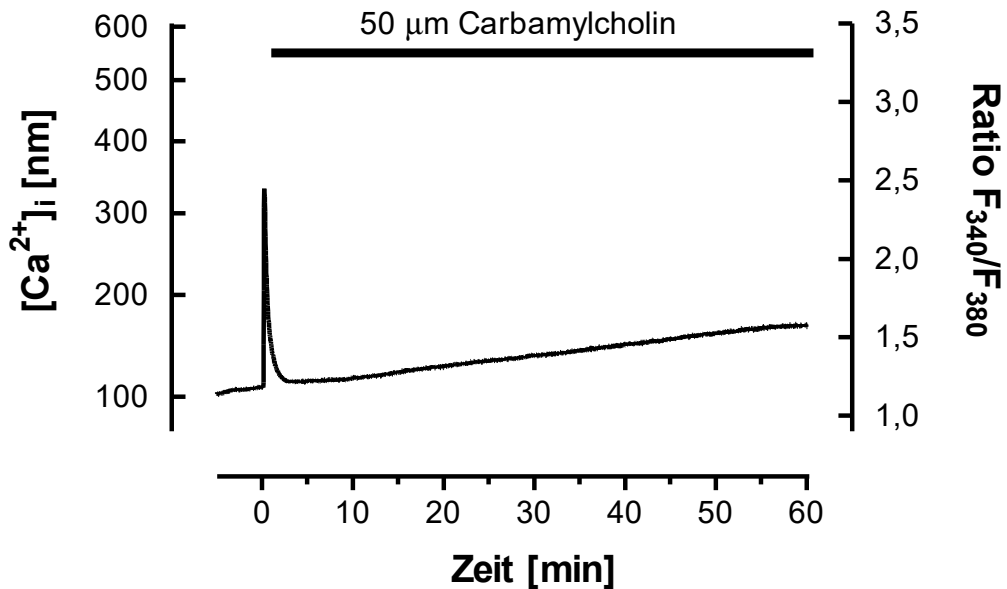


Abb. 55: Einfluß von Carbamylcholin (50  $\mu M$ ) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (ohne Carbamylcholin) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Carbamylcholin (50  $\mu M$ ) ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus jeweils 4 Versuchen.

### **3.1.9.1 Einfluß von Carbamylcholin (50 $\mu\text{M}$ ) in von Glucose (10 oder 15 mM) auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Untersucht wurde der Einfluß von Carbamylcholin (50  $\mu\text{M}$ ) auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln in Gegenwart von Glucose (10 oder 15 mM). Carbamylcholin induzierte in Gegenwart von Glucose zunächst einen kurzen Peak der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Diesem schlossen sich bei beiden getesteten Glucosekonzentrationen schnelle Oszillationen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mit kleiner Amplitude an (Abb. 56).

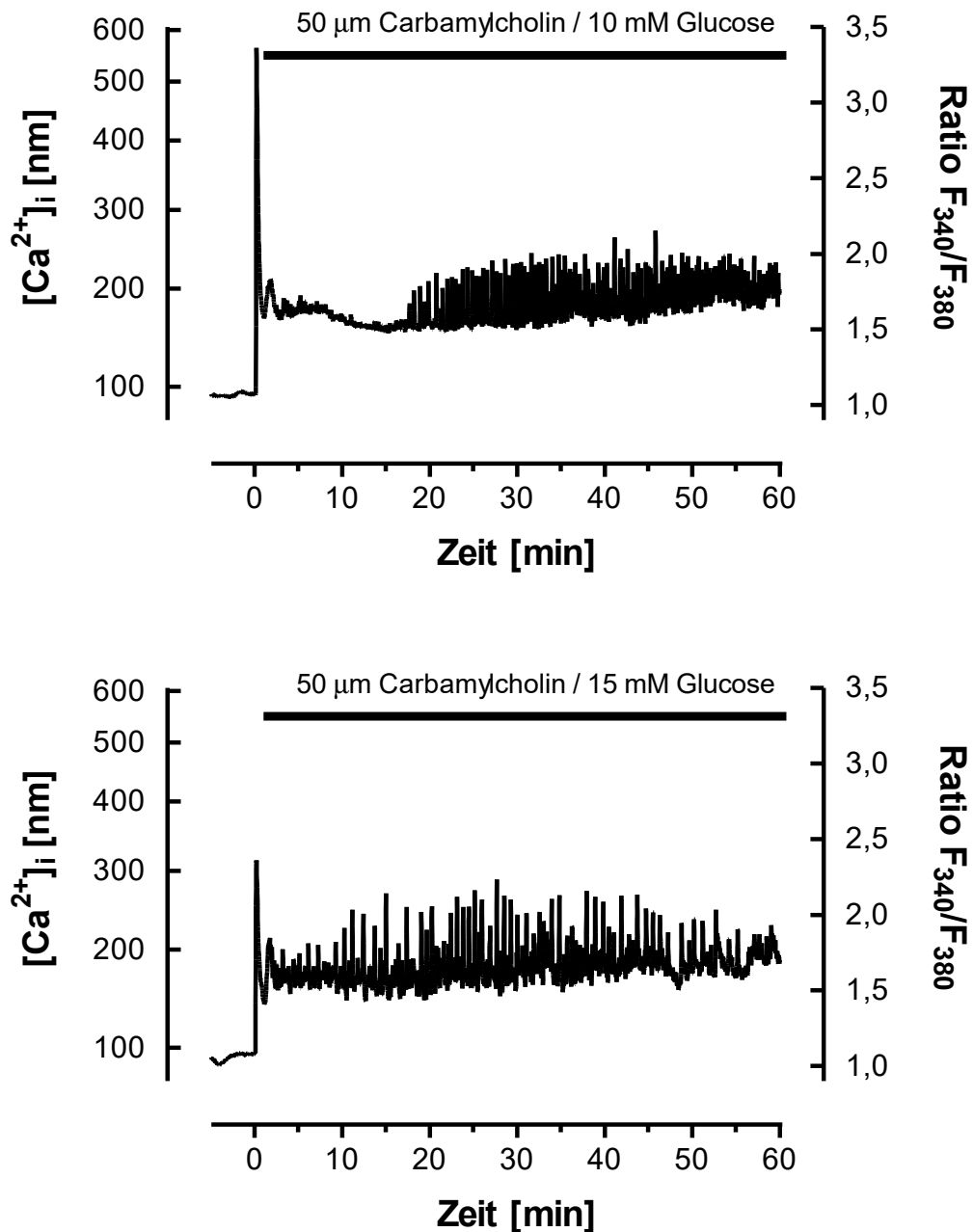


Abb. 56: Einfluß von Carbamylcholin (50 µM) plus 10 mM (oben) und 15 mM Glucose (unten) auf die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Carbamylcholin (50 µM) plus Glucose (10 oder 15 mM) ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve aus jeweils 4 Versuchen.



### 3.1.9.2 Einfluß von 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln

Untersucht wurde der Einfluß von 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX) (1mM), einem Potentiator der glucoseinduzierten Insulinsekretion, auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Pankreasinseln in Gegenwart von Glucose (10 mM). IBMX induzierte in Gegenwart von Glucose einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Diesem schlossen sich schnelle Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  an (Abb. 58). In Abwesenheit von Glucose vermochte IBMX (1 mM) die  $[Ca^{2+}]_i$  nicht zu beeinflussen (nicht dargestellt).

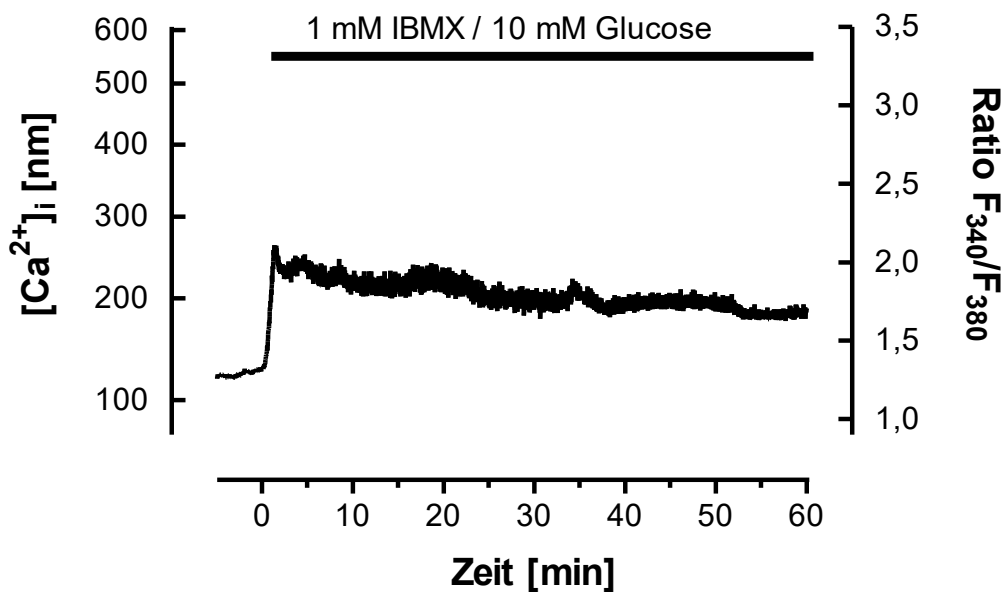


Abb. 57: Einfluß von 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX) (1 mM) plus 10 mM Glucose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit IBMX (1 mM) plus Glucose (10 mM) ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 3 Versuchen.

## **3.2 Einfluß von verschiedenen Stoffwechselfsubstraten auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Beta-Zellen des Pankreas der Maus**

### **3.2.1 Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen (10-20 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Beta-Zellen des Pankreas**

Untersucht wurde der Einfluß von Glucose auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in **isolierten Beta-Zellen** des Pankreas der Maus nach einer Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 10 bzw. 20 mM. Glucose induzierte zunächst einen kurzzeitigen, leichten Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ , dem ein transientser Anstieg folgte. Diesem schlossen sich spontane Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  mit langsamer Frequenz an (Abb. 58). Im Gegensatz zu den langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in intakten Pankreasinseln, die auf einem erhöhten Niveau erfolgten (siehe 3.1.1), gingen die langsamen Oszillationen von isolierten Beta-Zellen vom Basalniveau aus (Abb. 58).

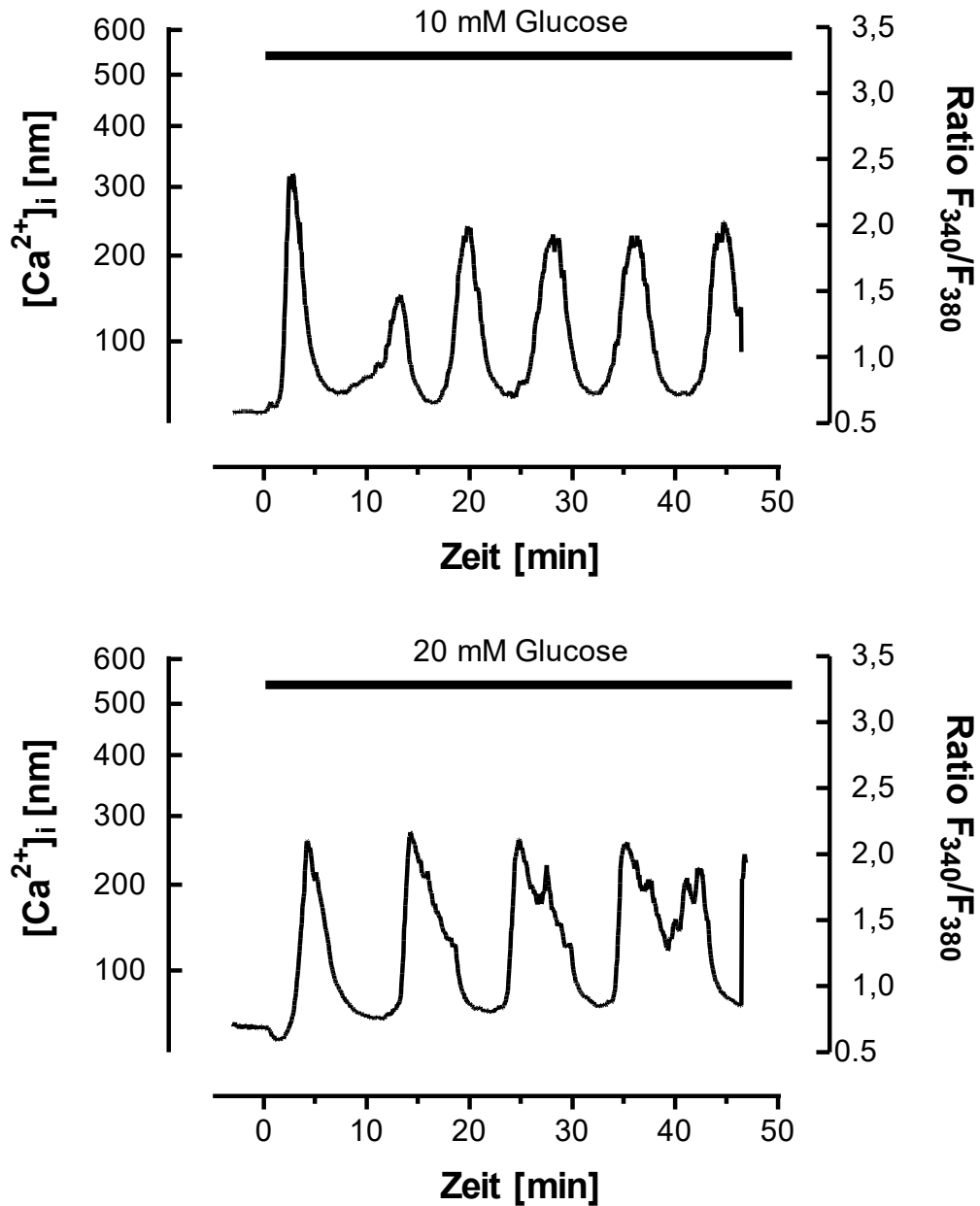


Abb. 58: Einfluß von Glucose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Beta-Zellen des Pankreas der Maus nach einer Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 10 mM (oben) und 20 mM (unten).

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit Glucose ist durch schwarze Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist jeweils eine typische Kurve 4 bzw. 2 Versuchen.

### 3.2.1.1 Abhängigkeit der Frequenz der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Beta-Zellen des Pankreas von der Glucosekonzentration

Tabelle 13: Vergleich der Frequenzen der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Beta-Zellen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration.

Glucose-konzentration [mM]	Frequenz [min <sup>-1</sup> ] (Anzahl der Versuche)
10	0,15 ± 0,01 (16)
20	0,08 ± 0,003 (3)

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.

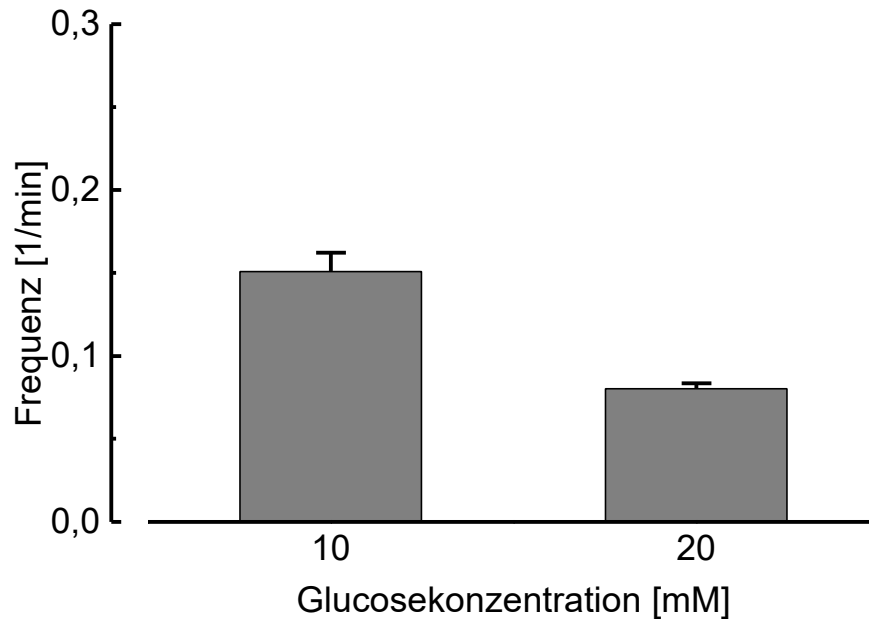


Abb. 59: Abhängigkeit der Frequenzen der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Beta-Zellen von der Glucosekonzentration.

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationsfrequenzen, die sich aus Tabelle 13 ergeben.

### 3.2.1.2 Vergleich des Musters der langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ von isolierten Beta-Zellen und Clustern von Beta-Zellen des Pankreas nach Stimulation mit Glucose (10 mM)

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der intrazellulären freien Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) nach einer Stimulation mit 10 mM Glucose, aufgenommen mit dem Imaging Meßsystem (siehe Kapitel 2.6.8). Abb. 60 zeigt acht ausgewählte Bilder von isolierten Beta-Zellen und Clustern von Beta-Zellen aus sechs bzw. acht Zellen. Dabei zeigte sich, daß nicht alle Einzelzellen in gleicher Weise auf den Stimulus reagieren. Während die beiden Cluster (Abb. 60/1/C bzw. /1/D) einen relativ frühen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  zeigen, war dieser bei den beiden Einzelzellen verzögert (Abb. 60/1/A bzw. /1/B). Auch die Oszillationsmuster der  $[Ca^{2+}]_i$  unterscheiden sich deutlich voneinander. Die Cluster zeigen ein Muster mit einem Plateau der  $[Ca^{2+}]_i$ , während von den zwei Einzelzellen nur eine Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  aufweist, die andere jedoch nach dem initialen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  auf ein Basalniveau zurückfällt. Die

Der zeitliche Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  der einzelnen Zellen in den beiden dargestellten Clustern war zu jedem Zeitpunkt synchron (nicht dargestellt).

Es handelt sich bei den dargestellten Bildern um Ratiodarstellungen, die sich bei der Bildung des Quotienten von zwei Bildern ergeben, die bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen aufgenommen wurden (siehe Kapitel 2.7.2). Um Änderungen des Quotienten deutlicher zu machen, wurden die ursprünglich in Graustufen vorliegenden Bilder mit Falschfarben eingefärbt. Dabei entspricht die Farbe Blau einem niedrigen Quotienten und die Farbe Rot einem hohen Quotienten. Die Quotienten wurden in Calciumkonzentrationen umgerechnet (siehe Kapitel 2.6.5) und diese als Farbbalken zwischen den Bildern dargestellt.

Um eine Zuordnung der einzelnen Bilder aus Abb. 60 zum jeweiligen Zeitpunkt in der Kurve in Abb. 61 zu ermöglichen

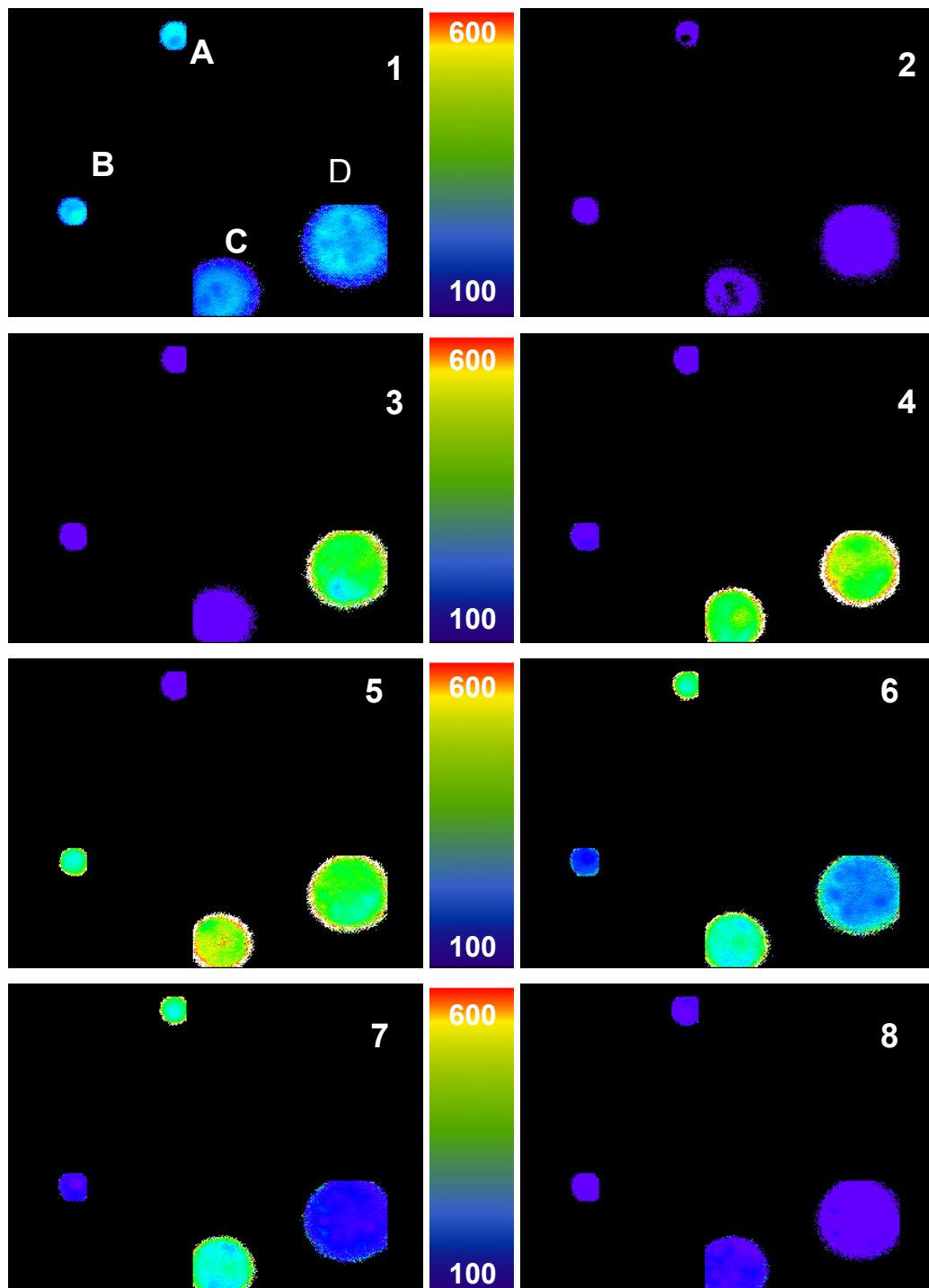


Abb. 60: Falschfarbenbilder von isolierten Beta-Zellen (A und B) und Clustern (C und D) aus Pankreasinseln.

Der Farbbalken zwischen den Bildern zeigt die  $[Ca^{2+}]_i$  in nM, die den jeweiligen Farben zugeordnet ist.

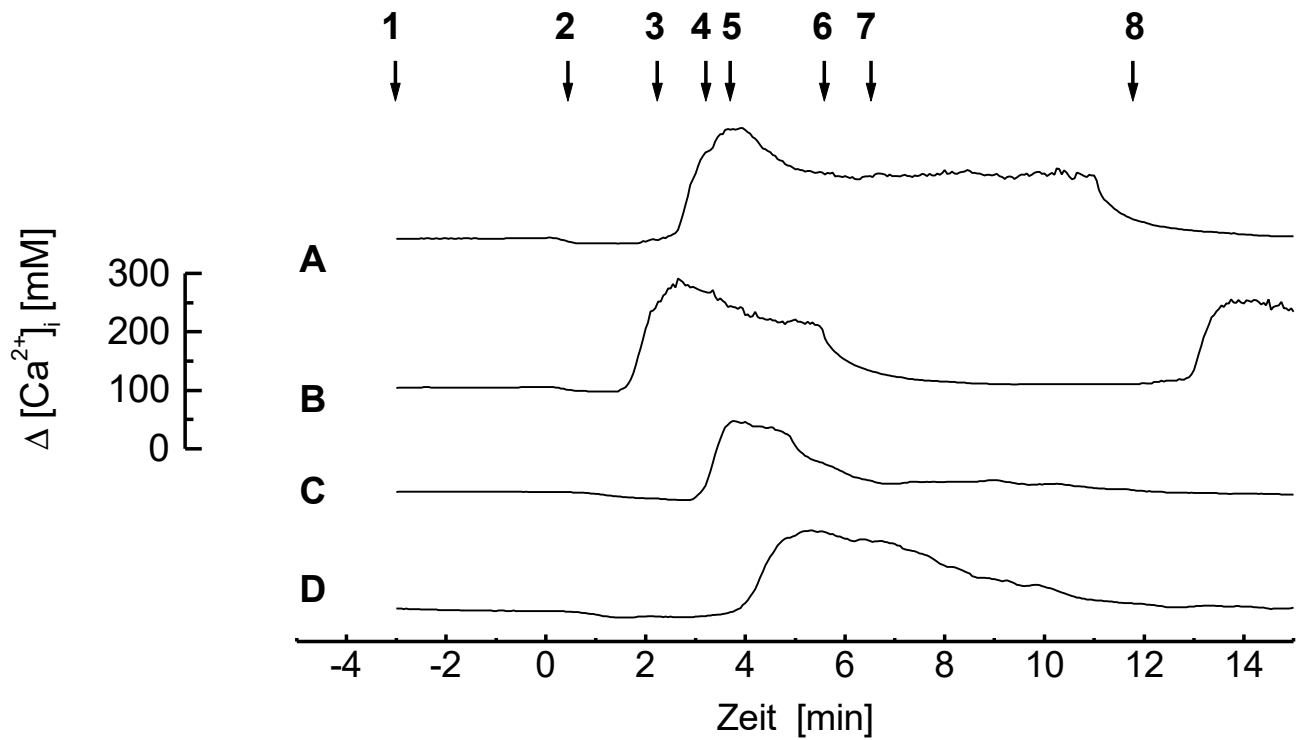


Abb. 61: Einfluß von Glucose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Beta-Zellen und Clustern von Beta-Zellen des Pankreas der Maus nach einer Erhöhung der Glucosekonzentration von  $mM$  auf  $10 mM$ .

Der Wechsel vom Basalmedium ( $5 mM$  Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug  $3 min$ . Dargestellt sind die ersten  $15 min$  eines insgesamt  $50 min$ ütigen Experiments. Die Kurven A bis D repräsentieren die Antwort der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Beta-Zellen bzw. Clustern aus Abb. 60/1. Die Pfeile am oberen Rand der Graphik indizieren das jeweilige Falschfarbenbild aus Abb. 60

### 3.2.2 Einfluß von $\alpha$ -Ketoisocaprönsäure (KIC) (5 mM) plus Glucose (10 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Beta-Zellen des Pankreas

Untersucht wurde der Einfluß von KIC (5 mM) auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Beta-Zellen des Pankreas der Maus in Gegenwart von Glucose (10 mM). KIC induzierte in der Gegenwart von Glucose zunächst einen kurzzeitigen, leichten Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$ , dem ein transienter Anstieg folgte. Diesem schlossen sich auf erhöhtem  $[Ca^{2+}]_i$ -Niveau unregelmäßige Transienten der  $[Ca^{2+}]_i$  an (Abb. 62).

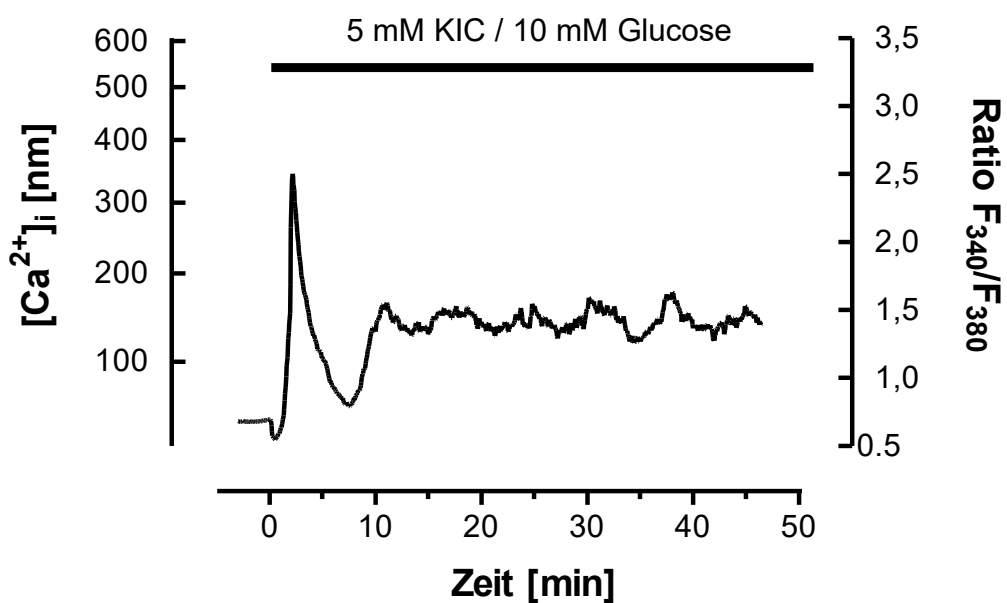


Abb. 62: Einfluß von KIC (5 mM) plus 10 mM Glucose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Beta-Zellen des Pankreas.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit KIC (5 mM) und Glucose (10 mM) ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 3 Versuchen.



### 3.2.2.1 Einfluß von Tolbutamid (200 $\mu\text{M}$ ) plus Glucose (10 mM) auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Beta-Zellen des Pankreas

Untersucht wurde der Einfluß von Tolbutamid (200  $\mu\text{M}$ ) auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in isolierten Beta-Zellen des Pankreas der in Gegenwart von Glucose (10 mM). Tolbutamid induzierte in Gegenwart von Glucose einen transienten Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dem sich spontane langsame Oszillationen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  anschlossen (Abb. 63). Die Plateaus dieser Oszillationen waren schmaler als die Täler (Abb. 63).

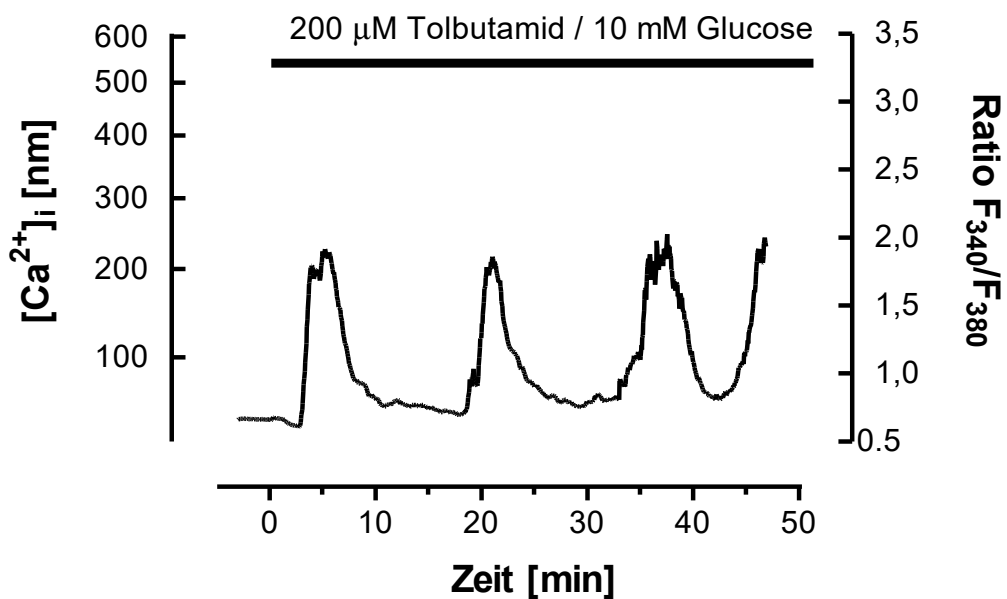


Abb. 63: Einfluß von Tolbutamid (200  $\mu\text{M}$ ) plus Glucose (10 mM) auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in isolierten Beta-Zellen des Pankreas.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 3 min. Die Dauer der Stimulation mit Tolbutamid (200  $\mu\text{M}$ ) plus Glucose (10 mM) ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 3 Versuchen.

### 3.2.2.2 Einfluß von N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBPD) (200 $\mu$ M) plus Glucose (10 mM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Beta-Zellen des Pankreas

Untersucht wurde der Einfluß von NBPD (200  $\mu$ M) auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in isolierten Beta-Zellen des Pankreas der Maus in Gegenwart von Glucose (10 mM). NBPD induzierte in Gegenwart von Glucose einen transienten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  dem sich spontane langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  mit großer Amplitude anschlossen (Abb. 64). Die Plateaus dieser Oszillationen waren breiter als die Täler.

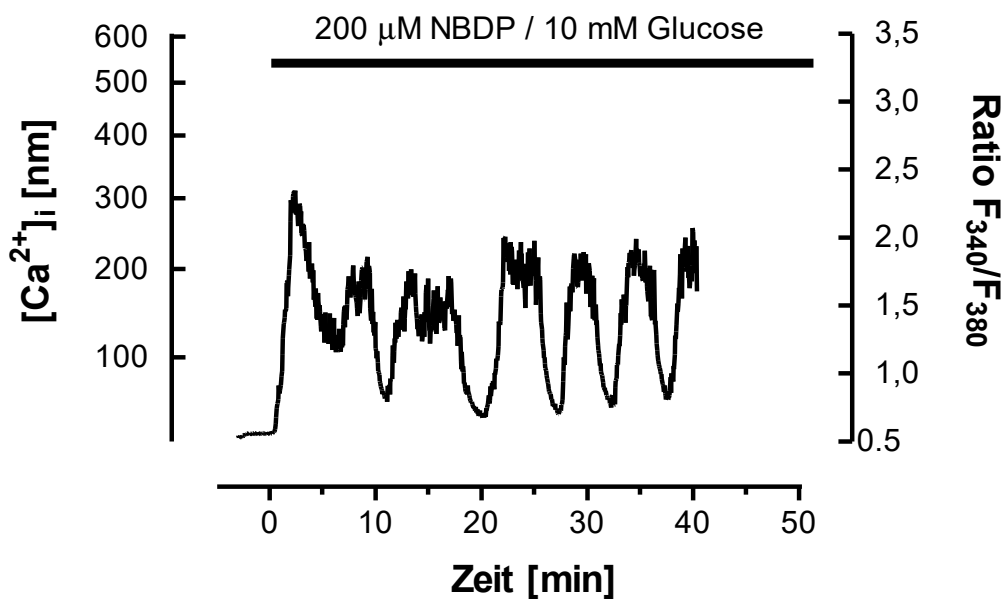


Abb. 64: Einfluß von NBPD (200  $\mu$ M) plus Glucose (10 mM) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Beta-Zellen des Pankreas.

Der Wechsel vom Basalmedium (5 mM Glucose) zum Testmedium erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0. Die Vorperifusionsphase mit dem Basalmedium betrug 5 min. Die Dauer der Stimulation mit NBPD (200  $\mu$ M) plus Glucose (10 mM) ist durch einen schwarzen Balken gekennzeichnet. Abgebildet ist eine typische Kurve aus 3 Versuchen.

### 3.3 Einfluß verschiedener Nährstoffen und anderen Substanzen mit insulinsekretorischer Wirkung auf die Oxidation von [U-<sup>14</sup>C]-Glucose in isolierten Pankreasinseln der Maus

Untersucht wurde der Einfluß von verschiedenen Nährstoffen und anderer insulinsekretorisch wirksamer Substanzen auf die Oxidationsrate von [U-<sup>14</sup>C]-Glucose in isolierten Pankreasinseln der Maus. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 14 zusammengefaßt. Es zeigte sich, daß das glycolytische Substrat Glycerinaldehyd eine hemmende Wirkung auf die Oxidationsrate von [U-<sup>14</sup>C]-Glucose hatte (Tabelle 14). Alle anderen Substrate beeinflussten diese nicht signifikant.

*Tabelle 14: Einfluß verschiedener Nährstoffen und anderen Substanzen mit insulinsekretorischer Wirkung auf die Oxidation von [U-<sup>14</sup>C]-Glucose in isolierten Pankreasinseln der Maus.*

Glucose 10 mM + Zusatz	Konzentration [mM]	Glucoseoxidations- rate ± SEM [pmol/Insel 60 min]
-		20,7 ± 2,3 (10)
KIC	5	26,3 ± 7,8 (4)
KIC	10	21,5 ± 5,8 (4)
DGA	10	11,8 ± 4,3 (5)*
Pyruvat	10	19,5 ± 6,0 (4)
Carbamylcholin	0,05	24,3 ± 7,8 (3)
Tolbutamid	0,2	25,8 ± 5,3 (4)
NBDP	0,2	26,5 ± 6,1 (4)
Methylpyruvat	10	14,7 ± 4,3 (3)

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die Anzahl der Versuche ist in Klammern angegeben.  
(\* p < 0,01 gegen Glucose ohne Zusatz)

## 4 Diskussion

Seit langem ist bekannt, daß die Insulinsekretion sowohl in vivo als auch in vitro pulsatil verläuft (*Goodner et al. 1977; Stagner & Samols 1985; Chou & Ipp 1990; Tornheim 1997*). Der freien intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) kommt eine zentrale Bedeutung als Second Messenger in der Stimulus-Sekretions-Kopplung in den Beta-Zellen des Pankreas zu (*Übersichten bei Wollheim & Sharp 1981; Prentki & Matschinsky 1987*). Deshalb war es nicht überraschend, als festgestellt wurde, daß in stimulierten Beta-Zellen des Pankreas auch die  $[Ca^{2+}]_i$  oszillierte (*Rosario et al. 1986*). Heute ist akzeptiert, daß Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  ein den Oszillationen der glucoseinduzierten Insulinsekretion vergleichbares Muster haben und erstere für letztere ursächlich verantwortlich zu sein scheinen (*Bergsten 1995*). Diesen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  liegen offenbar wiederum Oszillationen im Stoffwechsel der Beta-Zellen zugrunde (*Übersicht bei Tornheim 1997*). Diese metabolischen Oszillationen werden offenbar in der Glykolyse generiert (*Hess 1979*). Dabei kommt der Phosphofruktokinase (PFK-1), welche die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat (F16BP) katalysiert, eine zentrale Rolle zu (*Boiteux et al. 1975*). Bei der PFK-1 handelt es sich um das Enzym der Glykolyse mit der komplexesten Regulation (*Dunaway et al. 1988*). Man unterscheidet verschiedene Isoenzyme, und zwar:

- 1) den L-Typ, der vorwiegend in der Leber vorkommt (L-PFK-1),
- 2) den M-Typ, der vorwiegend im Muskel vorkommt (M-PFK-1),
- 3) den C-Typ, der vorwiegend in Fibroblasten vorkommt (C-PFK-1).

Alle drei Subtypen der PFK-1 werden durch ATP und Citrat gehemmt sowie durch eine Reihe von Substanzen aktiviert, insbesondere ADP, cAMP sowie Fructose-2,6-bisphosphat (F26BP) und Fructose-1,6-bisphosphat (F16BP). Letzteres bewirkt jedoch ausschließlich bei der PFK-1 vom M-Typ, insbesondere in Gegenwart von AMP, eine autokatalytische Aktivierung (*Tornheim 1988*). In den Beta-Zellen des Pankreas kommt neben dem L- und C-Typ überwiegend dieser M-Typ der PFK vor (*Yaney et al. 1995*). L- und C-Typ werden nur schwach durch F26BP aktiviert und tragen somit nicht zum oszillatorischen Verhalten bei (*Tornheim 1997*). Das überwiegende Vorhandensein der M-Typ PFK-1 stattet die Beta-Zelle mit der Fähigkeit zu glykolytischen Oszillationen aus. Diese spiegeln sich in der Folge des weiteren Stoffwechselschicksals von Glucose in Oszillationen des ATP/ADP-

Quotienten wider (*Nilsson et al. 1996*). Durch Interaktion mit dem  $K_{ATP}$ -Kanal kommt es zu einer Depolarisierung der Plasmamembran der Beta-Zelle und in der Folge zu einem Calciumeinstrom.

Es war das Ziel dieser Dissertation, zur Klärung der Frage beizutragen, welchen Ursprungs die Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln sind. Unter Verwendung von mikrofluorimetrischen Methoden wurde sowohl in isolierten Pankreasinseln als auch in isolierten Beta-Zellen der Maus der zeitliche Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  unter Stimulation mit verschiedenen glykolytischen und mitochondrialen Substraten sowie blutzuckersenkenden Arzneimitteln und Substanzen, die über intrazelluläre Second Messenger wirken untersucht. Dabei sollte insbesondere geklärt werden, ob neben Glucose auch andere Substanzen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  induzieren können, bzw. welchen Einfluß diese Substanzen auf die glucoseinduzierten Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  haben.

#### **4.1 Einfluß von Glucose und Mannose auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln der Maus**

In Konzentrationen, in denen Glucose Insulinsekretion auslöst, induziert diese auch regelmäßige Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  (*Rosario et al. 1986; Valdeolillos et al. 1989; Hellman, 1992*). Diese regelmäßigen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  werden in der Mehrzahl der untersuchten isolierten Inseln beobachtet (*Hellman et al. 1994*). Dies konnte in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden. In ca. 50 % wurden regelmäßige langsame Oszillationen beobachtet, in weiteren ca. 25 % regelmäßige schnelle Oszillationen und im Rest der Inseln wurden keine regelmäßigen Oszillationen beobachtet.

Unter Stimulation mit verschiedenen Glucosekonzentrationen (10-40 mM) sowie mit Mannose (40 mM) zeigte sich in isolierten Pankreasinseln der Maus der typische biphasische Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$ . Einem transienten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Inselzellen schloß sich eine zweite Phase mit spontanen Oszillationen auf erhöhtem Konzentrationsniveau an. Diese waren über den gesamten Beobachtungszeitraum von 60 min stabil. Die Frequenz der Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  änderte sich konzentrationsabhängig. Bei Glucosekonzentrationen über 15 mM wurde eine Halbierung der Frequenz beobachtet (Abb. 8 und Abb. 9). In Abhängigkeit von der Glucosekonzentration kam es auch zu einer kontinuierlichen Erhöhung der mittleren  $[Ca^{2+}]_i$  in den Inseln (Tabelle 4).

Die Ursache dafür, daß nicht alle Inseln auf Glucosestimulation mit langsamen Oszillationen antworten, ist unbekannt (*Hellman et al. 1992*). Als mögliche Erklärung hierfür könnten Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung der einzelnen Inseln in Betracht kommen. Solche Heterogenitäten in Abhängigkeit von der Region des Pankreas sind bekannt (*Jörns et al. 1996*). Dennoch gelten die überwiegend auftretenden langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  als das typische Antwortmuster der Pankreasinsel der Maus. Langsame Oszillationen sind aber offenbar auch ein Qualitätsmerkmal. Auffallend ist, daß deren Häufigkeit auch von der Routine des Experimentators bei der Isolierung und Kultur der Inseln abhängt (*Hellman, persönliche Mitteilung*). Dies wird durch eigene Erfahrungen bestätigt.

Die typischen glucoseinduzierten, langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  ließen sich durch 2 mM Mannoheptulose, einen Inhibitor der Glucokinase (*Lenzen et al. 1987*) und der glucoseinduzierten Insulinsekretion (*Ashcroft & Randle 1970*), vollständig unterdrücken, wobei die  $[Ca^{2+}]_i$  auf den Fußpunkt der Oszillationen zurückging. Die Hemmung war sofort nach Entzug des Hemmstoffs reversibel. Diese Befunde sind ein weiterer deutlicher Hinweis auf den metabolischen Charakter der langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ . Diese Beobachtungen zeigen auch, daß es ohne einen Abbau der Glucose in der Glykolyse keine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  und somit auch keine Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  gibt. Diese Befunde erlauben jedoch keine Aussage über den „Generator“ der Oszillationen.

Der Einfluß der Hexose Mannose auf die  $[Ca^{2+}]_i$  ist demjenigen von Glucose vergleichbar. Mannose induzierte in einer Konzentration von 40 mM einen vergleichbaren biphasischen Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  wie Glucose in Konzentrationen von 10-15 mM. Ebenso wie Glucose wird Mannose bei Eintritt in die Glykolyse in millimolaren Konzentrationen in einem ersten Schritt durch die Glucokinase phosphoryliert. Dies wird auch durch die Tatsache belegt, daß mannoseinduzierte Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  ebenfalls durch Mannoheptulose reversibel unterdrückt werden können. Da die Glucokinase für Mannose einen höheren  $K_m$ -Wert besitzt, und die Mannose auch ein schwächerer Stimulus der Insulinsekretion ist, ist es auch plausibel, daß höhere Konzentrationen von Mannose für einen äquipotenten Effekt auf die  $[Ca^{2+}]_i$  erforderlich sind. Das weitere Stoffwechselschicksal der Mannose ist mit dem von Glucose identisch. Daher ergibt sich aus diesen Mannosebefunden kein weiterer Hinweis auf den „Generator“ der Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ .

Es stellte sich daher die Frage, ob vielleicht andere Substanzen mit Nährstoffcharakter Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  auslösen können, die weiteren Aufschluß über den Ursprung der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  geben könnten.

#### **4.2 Einfluß von anderen Substanzen mit Nährstoffcharakter auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln der Maus**

Neben Glucose als primärem Stimulus der Insulinsekretion wurde auch die Wirkung anderer glykolytischer und mitochondrialer Substrate (siehe Abschnitt 1.2) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  von Pankreasinseln untersucht. Diese Substanzen, sofern sie insulinsekretorisch wirksam sind, erzeugen wie Glucose das Signal für die Sekretion im Stoffwechsel der Beta-Zellen (siehe Abschnitt 1.3).

Es zeigte sich in diesen Untersuchungen, daß sowohl Glycerinaldehyd, das, neben Glucose, einzige andere insulinsekretorisch wirksame Glykolysesubstrat als auch  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC), ein insulinsekretorisch wirksames mitochondriales Substrat, in Abwesenheit von Glucose eine transiente monophasische Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Inseln der Maus auslösen konnten. Pyruvat, ein insulinsekretorisch unwirksames Glykolyseintermediat (*Lenzen & Panten 1981*), vermochte keine Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  zu induzieren. Dies bestätigt frühere Literaturbefunde über den Einfluß von Pyruvat auf die  $[Ca^{2+}]_i$  (*Roe et al. 1994*). Der membranpermeable Ester Methylpyruvat, der im Gegensatz zum Pyruvat Insulinsekretion auslöst (*Malaisse et al. 1996*), führte auch zu einer transienten monophasischen Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Inseln der Maus. Die Beobachtung von langsamen Oszillation der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Inseln der Maus durch 5 mM KIC (*Martin et al. 1995*) bzw. 20 mM Glycerinaldehyd (*Roe et al. 1994*) in Abwesenheit von Glucose ließen sich in den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigen. Abb. 65 zeigt schematisch den Eintritt der beschriebenen Nährstoffe in den Intermediärstoffwechsel.

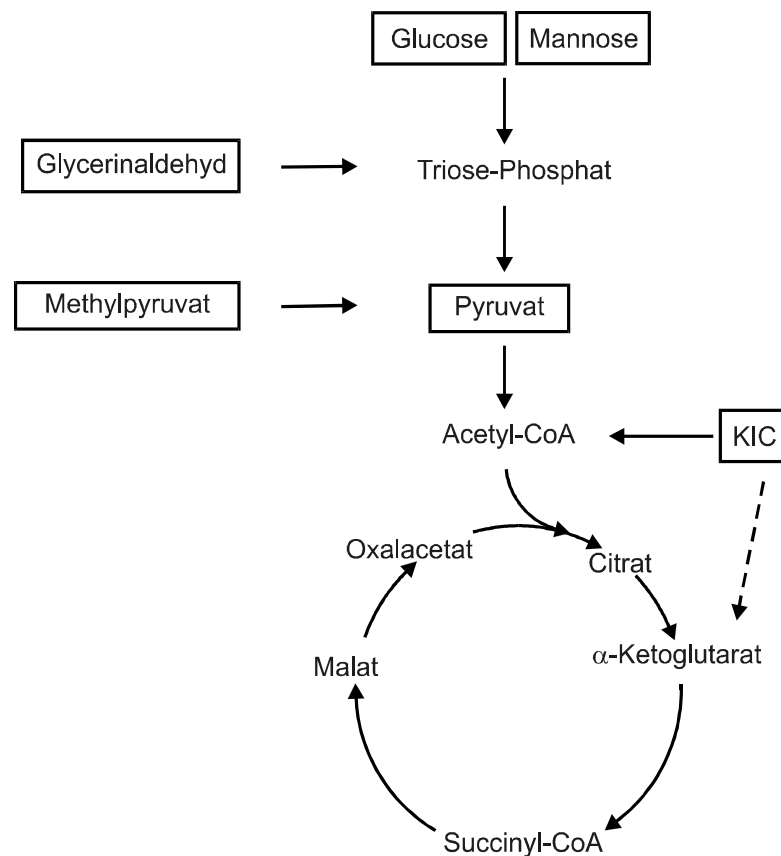


Abb. 65 : Eintritt von Nährstoffen in den Intermediärstoffwechsel

Somit läßt sich feststellen, daß außer Glucose und Mannose in hohen Konzentrationen keine Substanz mit Nährstoffcharakter in der Lage war, Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  zu induzieren. Daher wurde sodann untersucht, welchen Einfluß diese vier Testsubstanzen auf die durch Glucose (10 mM) induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  hatten.

Es zeigte sich, daß offenbar ausschließlich Substrate, die oberhalb des Triosephosphat-schritts in die Glykolyse eintreten, langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  induzieren können.

Dieser Befund deutet auf die Phosphofruktokinase (PFK-1) als den „Generator“ der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Beta-Zellen des Pankreas der Maus hin, da nur dieses Enzym im oberen Teil der Glykolyse eine komplexe Regulation aufweist, die einen oszillatorischen Stoffwechsel ermöglicht (siehe weiter oben). Die Regulation würde auf einer Hemmung der PFK-1 durch die Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten beruhen, die aus dem vollständigen Abbau der Glucose in Glykolyse und Citratzyklus resultiert. Die Hemmung der PFK-1 hat zur Folge, daß der Substratfluß durch die Glykolyse an dieser Stelle zum Stillstand kommt oder zumindest deutlich reduziert



wird. In der Folge verringert sich der ATP/ADP-Quotient, bedingt durch den ATP-Verbrauch der Beta-Zelle, woraufhin die PFK-1 erneut aktiviert und wieder ein erhöhter Stoffwechselfluß durch die Glykolyse ermöglicht wird.

### **4.3 Einfluß von anderen Substanzen mit Nährstoffcharakter auf glucoseinduzierte langsame Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln der Maus**

In Anwesenheit einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 5 mM induzierte Glycerinaldehyd (3 oder 10 mM) langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Pankreasinseln der Maus. Darüber hinaus reduzierte Glycerinaldehyd (3 oder 10 mM) die Frequenz von glucoseinduzierten (10 mM) langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in einem vergleichbaren Ausmaß, wie dies eine Erhöhung der Glucosekonzentration auf 20 mM oder mehr tat (siehe Tabelle 7).

Somit läßt sich feststellen, daß Glycerinaldehyd zwar nicht alleine langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  auszulösen vermochte, jedoch in Anwesenheit von Glucose gleichsinnige Effekte in Form langsamer Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  induzierte.

Das traf nicht zu für Pyruvat und auch nicht für seinen Ester Methylpyruvat. Beide Substanzen beseitigten die durch 10 mM Glucose induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ . Es waren nur noch schnelle Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  nachweisbar. Die Beseitigung der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  könnte auf einem rückstauartigen Auflaufen der glykolytischen Metabolite oberhalb des Pyruvats in der Glykolyse beruhen. Dieser Rückstau würde insbesondere auch einen Anstieg der Konzentration von Fructose-1,6-bisphosphat bewirken, das die PFK-1 stark aktiviert und auf diese Weise eine Hemmung des Enzyms unterbindet und somit die Oszillationen verhindert (*Tornheim 1988*).

Gleiches traf für KIC zu. Bereits in Anwesenheit einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 5 mM bewirkte KIC (5 oder 10 mM) einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , jedoch ohne langsame Oszillationen. Auch die durch 10 mM Glucose ausgelösten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  wurden durch Zugabe von KIC in schnelle Oszillationen umgewandelt.

Somit kann man zusammenfassend feststellen, daß sich Glucose und Glycerinaldehyd einerseits, Pyruvat und KIC andererseits gleichsinnig verhielten. Obwohl nur in Anwesenheit der ersten beiden Testsubstanzen langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ .

auftraten, ist die permanente Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in Anwesenheit all dieser Testsubstanzkombinationen angewiesen auf eine Phosphorylierung der Glucose durch die Glucokinase. Diese Schlußfolgerung wird dadurch bewiesen, daß Mannoheptulose als Inhibitor der Glucokinase (*Lenzen et al. 1987*) die Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Pankreasinseln zu unterdrücken vermochte.

Diese in den Versuchen mit verschiedenen Kombinationen von Glucose und anderen Nährstoffen erhobenen Befunde sind ein weiterer deutlicher Beleg dafür, daß der „Generator“ der langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  im oberen Teil der Glykolyse lokalisiert ist.

Die Tatsache, daß neben Glucose allein nur Glucose plus Glycerinaldehyd, die einzigen beiden Substrate, die auch in der Glykolyse ATP bilden, nicht jedoch das rein mitochondriale Substrat KIC langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  induzieren, führt zu der Frage, ob glykolytischem ATP eine besondere Signalfunktion zukommt. *Tornheim (1997)* vertritt in diesem Zusammenhang die Ansicht, daß glykolytisch generiertes ATP, obwohl nur einen Bruchteil der gesamten ATP-Produktion ausmachend, erheblichen Einfluß auf den ATP/ADP-Quotient in der Beta-Zelle hat. Da der größte Teil der Adennucleotide in der Beta-Zelle in Form von ATP vorliegt (*Tornheim 1997*), führt bereits eine leichte Erhöhung der ATP-Konzentration, die mit einer Verringerung der ADP-Konzentration einhergeht, zu einer deutlichen Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten. Dieser Umstand ist um so wichtiger, als daß der zytosolische ATP/ADP-Quotienten letztlich nicht nur für die Regulation der PFK-1 (*Tornheim 1997*), sondern auch des  $K_{ATP}$ -Kanals verantwortlich ist. Dazu ist anzumerken, daß bekannt ist, daß in frisch isolierten Pankreasinseln ein großer Teil des mitochondrial gebildeten ATP nicht frei im Zytosol verfügbar ist, sondern in Sekretgranula lokalisiert gespeichert wird und somit metabolisch inert ist (*Detimary et al. 1996*). Ein solches Konzept der Kompartimentierung steht in Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten und unterstützt das Konzept der PFK-1 als dem „Generator“ der langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  ganz wesentlich.

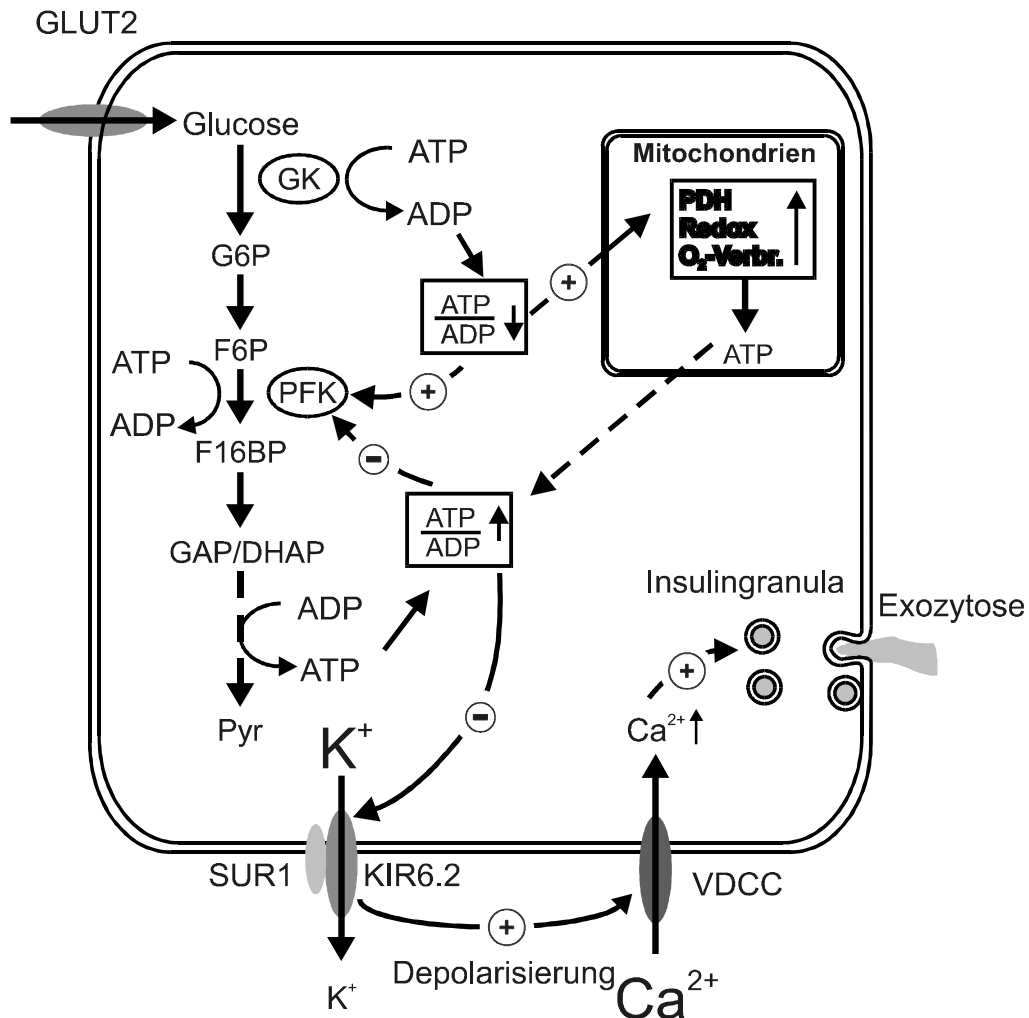


Abb 66: Regulation des Stoffwechsels der Beta-Zelle des Pankreas durch den ATP/ADP-Quotienten

(GLUT2 : Glucosetransporter; GK : Glucokinase; G6P : Glucose-6-Phosphat; F6P : Fructose-6-Phosphat; PFK-1 : Phosphofruktokinase-1; F16BP : Fructose-1,6-bisphosphat; GAP : Glycerinaldehydphosphat; DHAP : Dihydroxyacetonphosphat; Pyr : Pyruvat; ATP : Adenosintriphosphat; ADP : Adenosindiphosphat; SUR1 : Sulphonylharnstoffrezeptor; KIR6.2 : ATP-sensitiver Kaliumkanal; VDCC : spannungsabhängiger Calciumkanal; PDH : Pyruvatdehydrogenase)

Die mit Glukose, Glycerinaldehyd und KIC an isolierten Inselzellen (sowohl an einzelnen Zellen als auch an Clustern von mehreren Zellen) durchgeführten Versuche ergaben gleichsinnige Ergebnisse wie die Versuche an isolierten Inseln der Maus. Diese Einzelzellversuche belegen, daß die beobachteten Oszillationen in der jeweiligen Beta-Zelle generiert werden und nicht die Intaktheit der Insel erfordern. Parakrine Mechanismen spielen daher bei der Entstehung von langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  offenbar keine entscheidende Rolle. Es handelt sich bei diesen langsamen Oszillationen somit um

Einzelzellphänomene, was mit der Hypothese einer Stoffwechselflußregulation der Glykolyse auf der Ebene der PFK-1 gut vereinbar ist.

#### **4.4 Einfluß von blutzuckersenkenden Sulfonylharnstoffen und analog wirkenden Substanzen auf die Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Der ATP-sensitive Kaliumkanal ( $K_{ATP}$ -Kanal, KIR 6.2) der Beta-Zelle des Pankreas und der damit assoziierte Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1) stellen einen Kanal-Rezeptor-Proteinkomplex dar, der vielfältig reguliert ist. Für die Auslösung der Insulinsekretion ist ein Schließen dieses Kanals erforderlich, um eine Depolarisation der Plasmamembran zu bewirken. Physiologischerweise bei Glucose, aber auch bei anderen Stimulatoren der Insulinsekretion mit Nährstoffcharakter, geschieht dies durch eine Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten (siehe Kapitel 1.2.1).

Blutzuckersenkend wirksame Arzneimittel der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten chemischen Stoffklassen bewirken über eine Depolarisierung der Plasmamembran der Beta-Zelle ebenfalls eine Insulinsekretion, erzielen diese Wirkung jedoch an einer Bindungsstelle am SUR1. Was die Wirkung auf den  $K_{ATP}$ -Kanal in der Beta-Zelle des Pankreas angeht, könnte man diese Substanzen daher im weitesten Sinne als Wirkstoffe mit einer ATP-analogen Wirkung bezeichnen. Man würde von daher erwarten können, daß blutzuckersenkende Arzneimittel vom Typ der Sulfonylharnstoffe und Phenylalaninderivate eine zur Glucose synergistische Wirkung in Hinblick auf die Induktion von langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  haben könnten. Als Prototypen dieser beiden Substanzklassen sind für die Untersuchungen in dieser Arbeit der Sulfonylharnstoff Tolbutamid und das Phenylalaninderivat N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP) ausgewählt worden.

Sowohl Tolbutamid als auch NBDP induzierten einen typischen initialen transienten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  über 8-10 Minuten mit nachfolgender Rückkehr zu einem leicht erhöhten Basalniveau. Bei langen, über eine Stunde laufenden Registrierungen der  $[Ca^{2+}]_i$  zeigten sich etwa 30 Minuten nach Beginn der Exposition, sowohl unter Tolbutamid als auch unter NBDP, Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  mit einer extrem langsamen Frequenz von  $0,09 \text{ min}^{-1}$ . Das bedeutet eine Zahl von 2 bis 3 Oszillationen im Verlaufe einer einstündigen Expositionszeit. Das ist wesentlich weniger als bei alleiniger Glucosegabe zu beobachten war. Solche Oszillationen sind früher bereits von Fujitani und Yada (1994) für ein Derivat des NBDP beschrieben worden. Die Befunde der vorliegenden Arbeit bestätigen somit

diese früheren Beobachtungen. Die Ursache für diese spät auftretenden sehr langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  unter dem Einfluß dieser Testsubstanzen ist unbekannt. Offenbar besteht keinerlei Beziehung zu den durch Glucose induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ .

Bereits bei Anwesenheit einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 5 mM wurden in der Kombination mit Tolbutamid wie auch mit NBDP langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet, wie sie typischerweise durch 15 mM Glucose induziert werden. Zugabe dieser beiden Testsubstanzen zu höheren Glucosekonzentrationen (10 oder 15 mM) führte zu einer signifikanten Reduktion der Frequenz der langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ , wie sie in Abwesenheit dieser Testsubstanzen nur mit 20 mM Glucose zu beobachten war. Sogar die Zugabe dieser beiden Testsubstanzen zu hohen Glucosekonzentrationen von 20 mM führte noch zu einer weiteren leichten, aber dennoch signifikanten Reduktion der Frequenz der langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ . Dies war ein Effekt, der bei Glucosekonzentrationen von 30 mM oder 40 mM nicht mehr zu erzielen war.

Diese Befunde lassen sich zwanglos und schlüssig erklären auf der Basis einer synergistischen Wirkung von Tolbutamid bzw. von NBDP und der von ATP (und ADP) auf die Funktion des  $K_{ATP}$ -Kanals (siehe Abschnitt 1.3). Im Gegensatz zu diesen am SUR1 bindenden blutzuckersenkenden Arzneimitteln kommt dem ATP bzw. der Veränderung des ATP/ADP-Quotienten in der Beta-Zelle des Pankreas jedoch eine duale Funktion zu. Eine Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten bewirkt gleichzeitig eine Hemmung der PFK-1 und somit eine Hemmung des Stoffwechselflusses durch die Glykolyse sowie ein Schließen des  $K_{ATP}$ -Kanals. Jedoch nur an letzterer Stelle wirkt es synergistisch mit diesen blutzuckersenkenden Arzneimittelwirkstoffen. Das gleichzeitig anwesende Tolbutamid oder NBDP bewirkt sowohl eine Verlängerung der Schließungszeit wie auch der Öffnungszeit der Kanäle mit dem Ergebnis, daß die Zelle jeweils länger depolarisiert und repolarisiert bleibt. Dadurch bleiben auch die spannungsabhängigen Calciumkanäle länger geöffnet bzw. geschlossen, so daß die Phasen erhöhter und niedriger  $[Ca^{2+}]_i$  länger werden und sich seltener abwechseln. Dies wird an der Reduktion der Frequenz der langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  unter dem Einfluß von Tolbutamid und NBDP sichtbar.

In Abwesenheit von Substrat (Glucose) verursachen Tolbutamid (*Panten et al. 1996*) und infolge der gleichen Wirkungsweise (*Schwanstecher et al. 1998*) vermutlich auch NBDP

eine ATP-Verarmung der Beta-Zelle, was zu einem weiteren Abfall des ATP/ADP-Quotienten führt, da diese Substanzen sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Substrat durch ihre insulinsekretorische Wirksamkeit Energie verbrauchen. Wenn dann nach einer Verminderung der PFK-1-Hemmung durch einen vermehrten Stoffwechselfluß durch die Glykolyse wieder vermehrt energiereiche Phosphate gebildet werden, dauert es länger, bis durch Phosphorylierung die notwendige Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten erreicht ist, um den  $K_{ATP}$ -Kanal wieder zu schließen. Die Tatsache, daß bei der Frequenzreduktion durch Tolbutamid das rein mitochondriale Substrat KIC die Glucose nicht ersetzen kann, ist ein Beleg für die besondere Erfordernis von ATP glykolytischen Ursprungs. KIC ermöglicht eine permanente Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , bewirkt jedoch nicht die Entstehung langsamer Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ , was darauf hinweist, daß im Metabolismus des KIC generiertes ATP hinsichtlich einer synergistischen Funktion mit Tolbutamid am  $K_{ATP}$ -Kanal an die Stelle des im Glucosemetabolismus in der Glykolyse generierten ATP treten kann, nicht jedoch bei der Regulation der PFK-1. Letztlich liefert dies die Erklärung dafür, warum nicht jeder längerfristige Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  notwendigerweise mit langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  einhergeht.

Verschiedene Zusatzversuche, die speziell mit dem Ziel durchgeführten wurden, diese Hypothese zu testen, lieferten weitere Evidenz für deren Richtigkeit. Insbesondere sind in diesem Zusammenhang zu nennen die Beobachtungen, daß (1) Mannoheptulose die durch Glucose (5 oder 10 mM) plus Tolbutamid (200  $\mu$ M) oder plus NBDP (200  $\mu$ M) induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  beseitigen kann, und daß (2) diese beiden Testsubstanzen bei einer sehr niedrigen Glucosekonzentration (1 mM), die im wesentlichen nur einen Hexokinase vermittelten, jedoch keinen Glucokinase vermittelten Stoffwechselfluß durch die Glykolyse bewirkte, keine langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  induzieren konnten. All diesen verschiedenen Versuchsanordnungen ist gemeinsam das Fehlen eines Glucokinase vermittelten, ausreichenden Stoffwechselflusses durch die Glykolyse und einer damit verbundenen ausreichenden Erhöhung der ATP/ADP-Quotienten. Dies ermöglicht die zusammenfassende Schlußfolgerung, daß ohne das Vorhandensein eines Glucokinase vermittelten Stoffwechselflusses durch die Glykolyse in den Beta-Zellen des Pankreas eine Induktion von langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  nicht möglich ist.

Antazolin, ein insulinsekretorisch wirksames Derivat aus der Gruppe der Imidazoline, hat einen dem Tolbutamid und NBDP analogen, wenn auch etwas geringeren Effekt. Es verlangsamt ebenfalls die Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in Beta-Zellen des Pankreas. Diese Beobachtung ist deshalb interessant, weil kürzlich festgestellt wurde, daß Phentolamin, ein anderes insulinsekretorisch wirksames Imidazolinderivat, welches darüber hinaus noch eine agonistische Wirkung am adrenergen  $\alpha$ -Rezeptor besitzt, im Gegensatz zu Sulfonylharnstoffderivaten offenbar nicht an den SUR1 bindet, sondern direkt mit einer Bindungsstelle am ATP sensitiven Kaliumkanal interagiert und dadurch seine Wirkung auf die Beta-Zelle vermittelt (*Ämmälä et al. 1996*).

Eine weitere unabhängige Evidenz für einen Synergismus am Proteinkomplex aus  $K_{ATP}$ -Kanal und SUR1 von Glucose und Tolbutamid oder NBDP ergibt sich aus Versuchen, in denen die Inseln des Pankreas mit einer Kombination von Glucose und einer hohen Konzentration von Tolbutamid (*Lenzen 1975; Lenzen 1978*) oder NBDP stimuliert wurden. Wie schon vor vielen Jahren für die Insulinsekretion nachgewiesen, kam es auch bei den initialen  $[Ca^{2+}]_i$  Antwort zu einer biphasischen Erhöhung mit zwei klar voneinander unterscheidbaren Gipfeln mit einem zeitlichen Abstand von 120-180 Sekunden, was analogen alten Befunden für die insulinsekretorische Antwort entspricht (*Lenzen 1975; Zinkler et al. 1988*).

Dies belegt, daß Vertreter dieser beiden Wirkstoffgruppen letztlich zu Glucose synergistische Wirkungen vermitteln. Dies ist vor dem Hintergrund des heutigen Verständnisses von separaten Bindungsstellen für ATP und ADP am Kaliumkanalprotein sowie für Tolbutamid und NBDP am SUR1 Protein gut verständlich. Somit belegen diese Versuche eindeutig, daß Glucose einerseits und Tolbutamid bzw. NBDP andererseits ihre jeweils charakteristischen Wirkungsmechanismen zur Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  beibehalten und überdies synergistisch ein Muster mit typischen langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  induzieren.

#### **4.5 Einfluß von hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen auf die langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Gemeinsam ist Glucose und anderen Nährstoffen, wie auch den blutzuckersenkenden Arzneimitteln Tolbutamid und NBDP, daß sie alle, auch wenn über unterschiedliche Mechanismen, eine Depolarisation der Plasmamembran der Beta-Zelle bewirken und somit

über eine gemeinsame Endstrecke letztlich die Insulinsekretion auslösen (siehe Abschnitt 1.2).

Eine Erhöhung der KCl-Konzentration im Extrazellulärraum von 6 mM auf 20 mM führt bei Beta-Zellen des Pankreas wie auch bei anderen erregbaren Zellen zu einer dauerhaften Depolarisation (*Atwater et al. 1980*), die verbunden ist mit einer transienten Insulinsekretion (*Henquin & Lambert 1974*) und Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  für 5 bis 10 Minuten. Eine Erhöhung der KCl-Konzentration auf 20 mM führte in dieser Arbeit zu einem Verschwinden der durch 15 mM Glucose induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ . Dieser Versuch belegt somit, daß eine Depolarisation der Plasmamembran an sich, auch wenn sie in die gleiche Endstrecke wie die oben beschriebenen anderen Testsubstanzen einmündet, nicht zur Auslösung von langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  führt und die durch Glucose ausgelösten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  wie im Falle von Tolbutamid und NBDP nicht verstärkt sondern beseitigt. Depolarisierung führt somit in allen beobachteten Fällen zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , löst jedoch nicht notwendigerweise typische langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  aus. Es läßt sich somit schlußfolgern, daß langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  nur dann induziert werden, wenn es gelingt, über einen gesteigerten durch die Glucokinase vermittelten, erhöhten Stoffwechselfluß den ATP/ADP-Quotienten in den Beta-Zellen des Pankreas zu erhöhen, welcher wiederum die Möglichkeit schafft, regulierend auf die Funktionen der PFK-1 und des  $K_{ATP}$ -Kanals einzuwirken.

#### **4.6 Einfluß von Adrenalin auf die langsamen Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln**

Das Katecholamin Adrenalin führt in vivo und in vitro zu einer Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion (*Übersicht bei Porte & Robertson 1973*). Diese Wirkung ist allen Adrenozeptoragonisten mit einer  $\alpha_2$ -rezeptoragonistischen Wirkung gemeinsam (*Langer et al. 1983*). Zudem bewirkt Adrenalin eine Verringerung der Frequenz von glucoseinduzierten langsamen Oszillationen des Membranpotentials der Plasmamembran (*Cook & Perrera 1982*) sowie der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (*Gilon et al. 1993*). Adrenalin bindet an einen  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptor in der Plasmamembran der Beta-Zellen des Pankreas (*Morgan et al. 1994*) und bewirkt dadurch eine Hemmung der



Adenylatcyclase (Howell und Montague 1973), die ATP in cAMP überführt, was eine Abnahme der cAMP-Konzentration in den Beta-Zellen des Pankreas bewirkt (*Turtle & Kipnis 1967*). Bei cAMP handelt es sich um einen Second Messenger (*Übersicht bei Prentki & Matschinsky 1987*), der die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) erhöht und über diesen Mechanismus auch die Funktion der Beta-Zellen des Pankreas beeinflusst (*Übersicht bei Hedekov 1980*). Dazu gehören auch die Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion sowie die Reduktion der Frequenz der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen  $[Ca^{2+}]_i$  in den Beta-Zellen des Pankreas durch Adrenalin (*Gilon et al. 1993; Sharp 1996*).

Über die PKA können verschiedene Effekte in den Beta-Zellen des Pankreas vermittelt werden, die auch als Erklärung für die Reduktion der Frequenz der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Beta-Zellen des Pankreas durch Adrenalin dienen könnten. Dabei handelt es sich um (1) eine direkte Stimulation der Exozytose, deren molekularer Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist (*Sharp 1996*), (2) um direkte Effekte auf Ionenkanäle, insbesondere auch spannungsabhängige Calciumkanäle (VDCC) (*Morgan et al. 1994*) sowie (3) um einen direkten Effekt durch Phosphorylierung auf die Phosphofruktokinase 2 (PFK-2) (*Probst et al. 1989*), die Fructose-6-phosphat zu Fructose-2,6-bisphosphat phosphoryliert (*Tornheim 1988*), im Gegensatz zur PFK-1, welche Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat phosphoryliert (*Boiteux et al. 1975*).

Eine Zunahme von cAMP hat einen potenzierenden Effekt auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion (*Lernmark, 1974; Christie & Ashcroft 1984; Prentki & Matschinsky 1987; Sharp 1996*). Dabei zeigt sich, daß der potenzierende Effekt von cAMP auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion mit steigender Glucosekonzentration zunimmt (*Henquin & Meissner 1984*). Auch durch andere Stimulatoren induzierte Insulinsekretion (z.B.  $K^+$ ) wird durch eine cAMP Erhöhung verstärkt. Substanzen wie die Xanthinderivate Theophyllin und 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX), die durch Hemmung der Phosphodiesterase eine Erhöhung der cAMP Konzentration im Pankreas bewirken, lösen selbst keine Insulinsekretion aus (*Hellman et al. 1980; Siegel et al. 1980*). Sie sind somit keine Initiatoren der Insulinsekretion, sondern nur Potentioren (*Siegel et al. 1980*).

In den vorliegenden Untersuchungen ließ sich bestätigen, daß Adrenalin die Frequenz der langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  reduziert, wie für Adrenalin bereits früher von anderen Autoren (*Gilon et al. 1993*) und auch für den selektiven  $\alpha_2$ -Adrenozeptoragonisten

Clonidin belegt wurde (*Bergsten et al. 1994*). Initial führte die Adrenalinzugabe auch in den vorliegenden Versuchen zu einem transienten, einige Minuten andauernden vollkommenen Verschwinden der Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  (*Gilon et al. 1993*). Dies wurde in früheren Arbeiten mit einer kurz andauernden Repolarisierung der Plasmamembran der Beta-Zellen erklärt (*Gilon et al. 1993*). Danach setzten die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  mit einer langsameren Frequenz als zuvor wieder ein. Der dieser Wirkung von Adrenalin zugrunde liegende Mechanismus konnte bisher jedoch nicht geklärt werden (*Bergsten et al. 1994; Gilon et al. 1993*). In diesem Zusammenhang war daher in der vorliegenden Arbeit die Beobachtung von besonderem Interesse, daß IBMX zwar alleine keine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  auslöste, jedoch in der Lage war, die durch Glucose induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in eine permanente Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zu überführen. Zusammenfassend lassen sich diese Beobachtungen so interpretieren, daß eine Abnahme der intrazellulären cAMP Konzentration offenbar zu einer Abnahme der Frequenz der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Beta-Zellen des Pankreas führt, während eine Erhöhung zu einem Verlust dieser Oszillationen führt. Eine Erklärungsmöglichkeit, wie cAMP über eine Beeinflussung des Energiestoffwechsels die  $[Ca^{2+}]_i$  Oszillationen beeinflusst, bestände in einer Beeinflussung der Enzymaktivität der PFK-1. Dies könnte wie folgt geschehen. Veränderungen der cAMP Konzentration in der Beta-Zelle des Pankreas können die Aktivität einer cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) verändern (*Ashcroft 1980*), die wiederum die Aktivität der Phosphofruktokinase-2 (PFK-2) steuert. Das von der PFK-2 produzierte Fructose-2,6-bisphosphat wird nicht weiter in der Glykolyse abgebaut, sondern wirkt als starker Aktivator der glykolytischen PFK-1 (*Van Schaftingen et al. 1981; Malaisse et al. 1981; Tornheim 1988; Übersicht bei Hers 1990*) und beseitigt Oszillationen des glykolytischen Flusses in Muskelgewebeextrakten (*Tornheim 1988*). Somit könnte mittels einer Beeinflussung der Enzymaktivität der PFK-1 eine Erhöhung der cAMP Konzentration in der Beta-Zelle zu einem vermehrten und eine Senkung zu einem verminderten Stoffwechselfluß durch die Glykolyse führen. Eine Feedback Hemmung der PFK-1 durch ATP würde in Anwesenheit einer erhöhten Konzentration von Fructose-2,6-bisphosphat erschwert, was zu einer Erhöhung der Frequenz der glucoseinduzierten  $[Ca^{2+}]_i$  Oszillationen führen würde, wie in den vorliegenden Versuchen unter dem Einfluß von IBMX beobachtet. Im anderen Fall würde eine Feedback Hemmung der PFK-1 durch ATP in Anwesenheit einer verminderten

Konzentration von Fructose-2,6-bisphosphat erleichtert, was zu einer Reduktion der Frequenz der glucoseinduzierten  $[Ca^{2+}]_i$  Oszillationen führen würde, wie in den vorliegenden Versuchen unter dem Einfluß von Adrenalin beobachtet. Diese Hypothese befindet sich auch in Übereinstimmung mit einer Beobachtung von (Bergsten et al. 1994), deren Versuche zeigten, daß die exogene Gabe von Dibutyryl-cAMP, einem plasmamembrangängigen Ester des cAMP, ebenfalls zu einer Erhöhung der Frequenz von glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  führte.

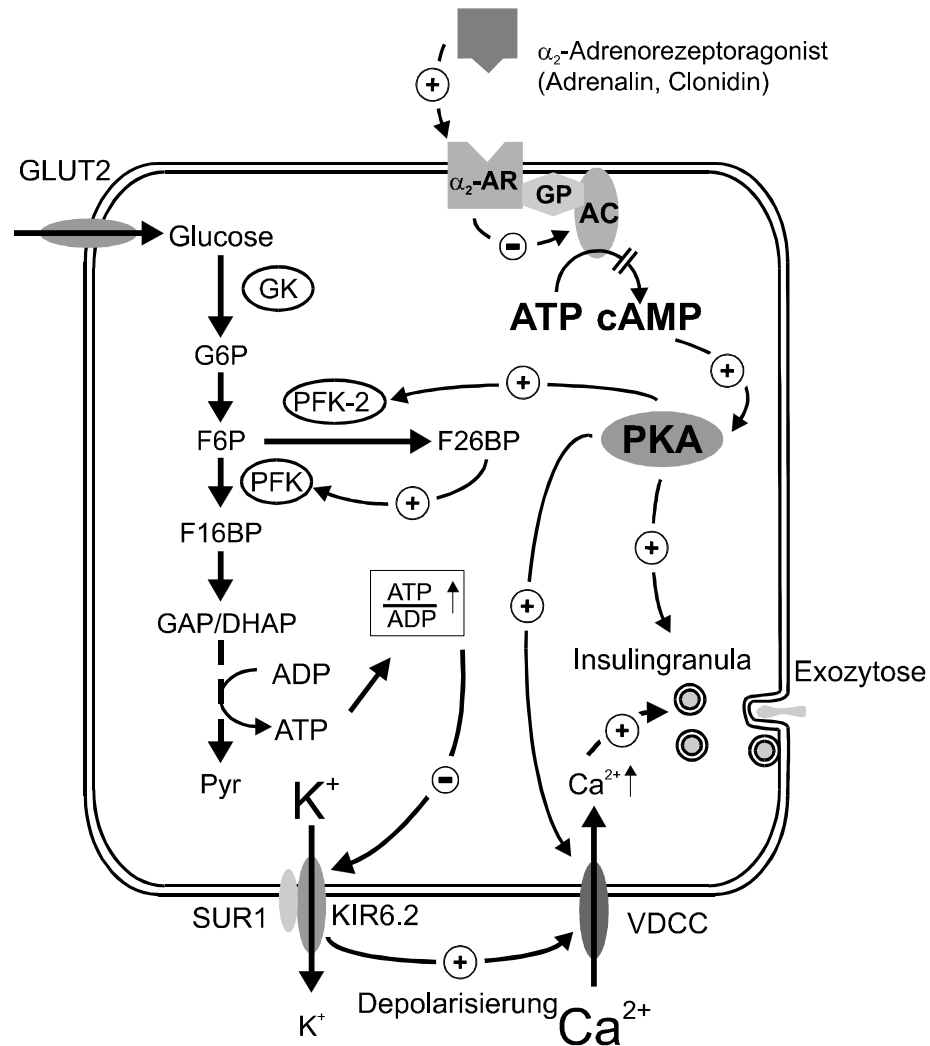


Abb 67: Einfluß von  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoragonisten auf PKA vermittelte Vorgänge in der Beta-Zelle des Pankreas

Einen weiteren Hinweis für diese Hypothese liefert die Beobachtung, daß der permanente Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in Pankreasinseln nach der Stimulation mit Glucose plus KIC durch die Gabe von Adrenalin in langsame Oszillationen umgewandelt wurde, die in ihrer Form

denen gleichen, die durch Glucose allein induziert wurden. Auch bei dieser Versuchsanordnung kam es nach der Zugabe von Adrenalin zu einer initialen Absenkung der  $[Ca^{2+}]_i$ , der sich langsame Oszillationen anschlossen. Der Effekt war reversibel, nach Entfernen des Adrenalin aus dem Medium verschwanden die langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ , und die Frequenz stieg wieder auf das ursprüngliche Niveau an. Auch dieser Effekt läßt sich durch den oben beschriebenen Mechanismus der Verringerung der cAMP-Konzentration erklären. Es ist bekannt, daß KIC im Vergleich zu Glucose eine stärkere Erhöhung der cAMP-Konzentration bewirkt (Panten et al. 1980). Dies führt in Gegenwart von Glucose, bedingt durch die hohe Fructose-2,6-bisphosphatkonzentration, zu einer permanenten Aktivierung der PFK-1, so daß auf diesem Wege keine langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  generiert werden können. Durch die Verringerung der Fructose-2,6-bisphosphatkonzentration nach Adrenalingabe kann es somit auch in Gegenwart von Glucose plus KIC zu langsamen Oszillationen der PFK-1-Aktivität und daraus resultierend, zu langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  kommen.

Die Zugabe von Mannoheptulose, einem Inhibitor der Glucokinase und der glucoseinduzierten Insulinsekretion, zu den adrenalinhaltigen Testmedien unterdrückte die langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  bei jeder getesteten Nährstoffkombination. Dies belegt, daß auch die durch Adrenalin modulierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  von einem glukokinasevermittelten Flux durch die Glykolyse abhängig sind.

Aus der älteren Literatur gibt es Hinweise dafür, daß IBMX und andere Xanthinderivate sowie andere Wirkstoffe, welche die cAMP Konzentration in den Beta-Zellen des Pankreas erhöhen, Calcium aus intrazellulären Speichern freisetzen können und dadurch zu der bekannten Verstärkung der glucoseinduzierten Insulinsekretion beitragen könnten (Wollheim Sharp 1981; Prentki & Matschinsky 1987). In diesen Studien wurde der Calciumnachweis in den Beta-Zellen noch mit radioaktiven Tracermethoden durchgeführt (Wollheim & Sharp 1981; Prentki & Matschinsky 1987). In späteren Studien mit Fluoreszenzindikatoren ließen sich jedoch keine Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$  nachweisen (Prentki & Matschinsky 1987; Islam et al. 1995).

Wie sich auch in der vorliegenden Studie bestätigen ließ, war mittels Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  mit einem Fluoreszenzindikator unter dem Einfluß von IBMX kein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Beta-Zellen des Pankreas nachzuweisen. Dies stellt unabhängige Evidenz für den oben postulierten Mechanismus der IBMX Wirkung vermittelt einer cAMP Erhöhung und

dadurch vermittelten Aktivierung der PFK-1 dar. Dennoch kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, daß Aktivatoren der Adenylatcyclase wie IBMX in Anwesenheit stimulatorischer Glucosekonzentrationen eine glucosevermittelte Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern steigern, auch wenn es hierfür keine direkten experimentellen Hinweise gibt.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung stellte sich daher die Frage, welche Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  Wirkstoffe induzieren können, die Calcium aus bekanntermaßen intrazellulären Speichern, insbesondere aus dem endoplasmatischen Retikulum der Beta-Zellen des Pankreas, mobilisieren (*Lenzen & Rustenbeck 1991*). Daher wurde Carbamylcholin, ein stabiler Analog des Acetylcholins, getestet, welcher über eine Interaktion mit Muskarinrezeptoren in der Plasmamembran der Beta-Zellen eine Erhöhung des Second Messengers 1,3,5-Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) vermittelt (*Prentki & Matschinsky 1987; Miura et al. 1997*). Im Gegensatz zu IBMX induzierte Carbamylcholin einen transienten Peak der  $[Ca^{2+}]_i$ , der auf das Basalniveau zurückfiel. In Anwesenheit von Glucose beseitigten Carbamylcholin ebenso wie IBMX die typischen langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ , so daß nur noch eine dauernde Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zu beobachten war. Bei Carbamylcholin, jedoch nicht bei IBMX, fielen zusätzliche sogenannte hochfrequente Spikes der  $[Ca^{2+}]_i$  auf. Diese Befunde belegen, daß eine Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum offenbar nicht an der Entstehung der typischen glucoseinduzierten Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  beteiligt ist (*Liu et al. 1995*).

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde bestätigen in ihrer Gesamtheit die Hypothese, daß die langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  ihren Ursprung im glykolytischen Stoffwechsel der Beta-Zelle des Pankreas haben. Offenbar spielt insbesondere die durch den ATP/ADP-Quotienten direkt und über cAMP indirekt regulierte Phosphofruktokinase-1 die entscheidende Rolle für die Generierung der charakteristischen langsamen glucoseinduzierten Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ . Diese Hypothese wird durch neuere, in der Literatur berichtete klinische Beobachtungen gestützt, in denen Patienten beschrieben werden, die aufgrund eines genetisch bedingten Defekts der PFK-1 keine Oszillationen der Insulinsekretion aufwiesen und klinisch einen Typ IIa Diabetes manifestieren (*Ristow et al. 1997*).

Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß die langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  möglicherweise nicht der Auslöser der pulsatilen Insulinsekretion sind. Neuere Arbeiten

---

von Westerlund et al. (1997) zeigen, daß auch Pankreasinseln, deren langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  mit hohen Tolbutamid- oder extrazellulären Kaliumkonzentrationen infolge der dadurch induzierten Dauerdepolarisation beseitigt wurden, noch eine pulsatile Insulinsekretion aufweisen. Es ist daher möglich, daß die langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ , ebenso wie die der Insulinsekretion nur eine Folge der metabolischen Oszillationen der Beta-Zelle sind.

Die durch die metabolischen Oszillationen ausgelöste pulsatile Insulinsekretion hat auch physiologische Relevanz. Es ist bekannt, daß eine pulsatile gegenüber einer kontinuierlichen Bereitstellung von Insulin eine größere hypoglykämische Wirkung hat (Matthews et al. 1983). Insbesondere bei Patienten, die einen nicht insulinpflichtigen Diabetes mellitus Typ IIa manifestieren, ist die pulsatile Insulinsekretion häufig gestört oder aufgehoben (O'Rahilly et al. 1988; Polonsky et al. 1988). Dieser Verlust der Pulsatilität scheint die Empfindlichkeit für die Insulinwirkung an den Zielorgane zu verringern.

## 5 Zusammenfassung

Eine Stimulation der Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas durch den physiologischen Stimulus Glucose löst eine Insulinsekretion aus, die begleitet wird von einer Erhöhung der freien intrazellulären Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Diese oszilliert sowohl in isolierten Langerhansschen Inseln als auch in Einzelzellen des Pankreas. Die Ursache für diese Oszillationen ist unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem neu aufgebauten mikrofluorimetrischen Meßsystem zur photometrischen und bildgebenden Datenerfassung der Einfluß von Glucose und verschiedenen anderen Stimulatoren der Insulinsekretion auf das oszillatorische Verhalten der  $[Ca^{2+}]_i$  untersucht in der Absicht, die zugrundeliegenden Mechanismen für die beobachteten Oszillationen aufzuklären.

Glucose, der physiologische Stimulus der Insulinsekretion nach Nahrungsaufnahme bei Mensch und Tier, induzierte konzentrationsabhängig langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ . Mannose, die einzige andere aber auch schwächer insulinsekretorisch wirksame Hexose, zeigte, wenn auch in höheren Konzentrationen, gleichsinnige Wirkungen auf die  $[Ca^{2+}]_i$ . Die typischen glucoseinduzierten, langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  ließen sich durch 2 mM Mannoheptulose, einen Inhibitor der Glucokinase und der glucoseinduzierten Insulinsekretion, vollständig und reversibel hemmen.

In einem nächsten Schritt wurden glykolytische Intermediate und andere insulinsekretorisch wirksame Nährstoffe untersucht. Dabei zeigte sich, daß das Glykolyseintermediat Glycerinaldehyd sowie die Ketosäure  $\alpha$ -Ketoisocaprionsäure (KIC), die beide Stimulatoren der Insulinsekretion sind, einen transienten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  induzierten, jedoch im Gegensatz zu Glucose keine Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  auslösten. Glycerinaldehyd verlangsamte die durch Glucose induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ , während das ausschließlich mitochondrial metabolisierte KIC diese beseitigte, so daß die  $[Ca^{2+}]_i$  auf einem erhöhten Niveau verblieb. Ähnliche Befunde wurden in analogen Versuchsanordnungen für das Glykolyseprodukt Pyruvat und seinen Ester Methylpyruvat erhoben.

Das blutzuckersenkend wirksame Sulfonylharnstoffderivat Tolbutamid, das als Arzneimittel in der Diabetestherapie eingesetzt wird, und das ebenfalls insulinsekretorisch wirksame N-Benzoyl-D-phenylalanin (NBDP), die beide eine Schließung des ATP-sensitiven Kaliumkanals bewirken und über diesen Mechanismus Insulinsekretion auslösen, induzierten ebenfalls langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ . Ihre Frequenz war noch wesentlich langsamer als bei den durch Glucose induzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ . In Anwesenheit von Glucose verlangsamten diese beiden Wirkstoffe die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  signifikant.

Der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoragonist Adrenalin hemmt die glucoseinduzierte Insulinsekretion und verringert die zelluläre cAMP Konzentration. Adrenalin verlangsamt auch die glucoseinduzierten Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  von Beta-Zellen des Pankreas. Das Xanthinderivat 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX), das durch eine Erhöhung der cAMP Konzentration als Potentiator der Insulinsekretion wirkt, induziert keinen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in Beta-Zellen des Pankreas. Dennoch wurden glucoseinduzierte langsame Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Zugabe von IBMX in ein permanent erhöhtes Niveau überführt. Sowohl die Abnahme der Frequenz der glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Adrenalin als auch die Erhöhung durch IBMX stellen offenbar durch den Second Messenger cAMP vermittelte modulierende Wirkungen dar. Diese Wirkungen können eine gemeinsame Erklärung in der Wirkung von cAMP auf die Proteinkinase A (PKA) finden. Die durch cAMP aktivierte PKA steuert die Aktivität der Phosphofruktokinase-2, die über ihr Produkt Fructose-2,6-bisphosphat die Phosphofruktokinase-1 aktiviert.

Um zu untersuchen, ob intrazelluläre Speicher für Calciumionen, speziell das endoplasmatische Retikulum, an der Entstehung von langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  beteiligt sind, wurde der Muskarinrezeptoragonist Carbamylcholin untersucht, der eine Erhöhung des Second Messengers Inositoltrisphosphat bewirkt. Carbamylcholin allein induziert lediglich einen transienten Peak der  $[Ca^{2+}]_i$ , war jedoch ebenfalls in der Lage, die glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  zu beseitigen. Diese Befunde belegen, daß eine Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern nicht an der Entstehung von glucoseinduzierten langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  beteiligt ist. Vielmehr deuten diese Beobachtungen darauf hin, daß nur eine Aufnahme von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum über spannungsabhängige Calciumkanäle in der Plasmamembran zu den Transienten der  $[Ca^{2+}]_i$  führt, während eine Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Speichern die  $[Ca^{2+}]_i$  in ein permanent erhöhtes Niveau überführt.

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde bestätigen in ihrer Gesamtheit die Hypothese, daß die langsamen Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$  ihren Ursprung im glykolytischen Stoffwechsel der Beta-Zelle des Pankreas haben. Dabei spielt die durch den ATP/ADP-Quotienten direkt und über cAMP indirekt regulierte Phosphofruktokinase-1 die entscheidende Rolle für die Generierung der charakteristischen langsamen glucoseinduzierten Oszillationen der  $[Ca^{2+}]_i$ .



## 6 Literaturverzeichnis

- Ämmälä, C., Moorhouse, A., Gribble, F., Ashfield, R., Proks, P., Smith, P. A., Sakura, H., Coles, B., Ashcroft, S. J. & Ashcroft, F. M. (1996). Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature* **379**: 545-8.
- Andreu, E., Soria, B. & Sanchez Andres, J. V. (1997). Oscillation of gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol Lond* **498**: 753-61.
- Ashcroft, F. M., Ashcroft, S. J. & Harrison, D. E. (1987). Effects of 2-ketoisocaproate on insulin release and single potassium channel activity in dispersed rat pancreatic beta-cells. *J Physiol Lond* **385**: 517-29.
- Ashcroft, S. J. (1980). Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis. *Diabetologia* **18**: 5-15.
- Ashcroft, S. J. & Randle, P. J. (1970). Mechanisms in the control of insulin release by glucose and other substances. *Adv Metab Disord* **1**: 51-7.
- Ashley, C. C. & Campbell, A. K. (1978). Free-calcium and tension responses in single barnacle muscle fibres following the application of L-glutamate. *Biochim Biophys Acta* **512**: 429-35.
- Atwater, I., Dawson, C. M., Scott, A., Eddlestone, G. & Rojas, E. (1980). The nature of the oscillatory behaviour in electrical activity from pancreatic beta-cell. *Horm Metab Res Suppl* **10**: 100-7.
- Bergsten, P. (1995). Slow and fast oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in pancreatic islets correspond to pulsatile insulin release. *Am J Physiol* **268**: E282-7.
- Bergsten, P., Grapengiesser, E., Gylfe, E., Tengholm, A. & Hellman, B. (1994). Synchronous oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets. *J Biol Chem* **269**: 8749-53.
- Berridge, M. J. & Galione, A. (1988). Cytosolic calcium oscillators. *Faseb J* **2**: 3074-82.
- Bessman, S. P., Beigelman, P. M. & Thomas, L. J., Jr. (1973). The periodicity of insulin secretion by islets of Langerhans shown by using a new apparatus. Preliminary data. *Biochem Med* **7**: 97-102.

- Boiteux, A., Goldbeter, A. & Hess, B. (1975).** Control of oscillating glycolysis of yeast by stochastic, periodic, and steady source of substrate: a model and experimental study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 3829-33.
- Chou, H. F., Berman, N. & Ipp, E. (1992).** Oscillations of lactate released from islets of Langerhans: evidence for oscillatory glycolysis in beta-cells. *Am J Physiol* **262**: 36.
- Chou, H. F. & Ipp, E. (1990).** Pulsatile insulin secretion in isolated rat islets. *Diabetes* **39**: 112-7.
- Christie, M. R. & Ashcroft, S. J. (1984).** Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and insulin secretion in intact islets of Langerhans. *Biochem J* **218**: 87-99.
- Cobbold, P. H. & Rink, T. J. (1987).** Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem. J.* **248**: 313-28.
- Cook, D. L. & Perrera, E. (1982).** Islet electrical pacemaker response to alpha-adrenergic stimulation. *Diabetes* **31**: 985-90.
- Detimary, P., Jonas, J. C. & Henquin, J. C. (1996).** Stable and diffusible pools of nucleotides in pancreatic islet cells. *Endocrinology* **137**: 4671-6.
- Diederichs, F. (1997).** A decrease of both (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> and (H<sup>+</sup>)<sub>i</sub> produces cell damage in the perfused rat heart. *Cell Calcium* **22**: 487-96.
- Dunaway, G. A., Kasten, T. P., Sebo, T. & Trapp, R. (1988).** Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochem J* **251**: 677-83.
- Dunne, M. J. & Petersen, O. H. (1986).** Intracellular ADP activates K<sup>+</sup> channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett* **208**: 59-62.
- Erecinska, M., Bryla, J., Michalik, M., Meglasson, M. D. & Nelson, D. (1992).** Energy metabolism in islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta* **1101**: 273-95.
- Fujitani, S., Ikenoue, T., Akiyoshi, M., Maki, T. & Yada, T. (1996).** Somatostatin and insulin secretion due to common mechanisms by a new hypoglycemic agent, A-4166, in perfused rat pancreas. *Metabolism* **45**: 184-9.
- Fujitani, S. & Yada, T. (1994).** A novel D-phenylalanine-derivative hypoglycemic agent A-4166 increases cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in rat pancreatic beta-cells by stimulating Ca<sup>2+</sup> influx. *Endocrinology* **134**: 1395-400.

- Gilon, P. & Henquin, J. C. (1992).** Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J Biol Chem* **267**: 20713-20.
- Gilon, P., Jonas, J. C. & Henquin, J. C. (1994).** Culture duration and conditions affect the oscillations of cytoplasmic calcium concentration induced by glucose in mouse pancreatic islets [see comments]. *Diabetologia* **37**: 1007-14.
- Gilon, P., Shepherd, R. M. & Henquin, J. C. (1993).** Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> as evidences in single pancreatic islets. *J Biol Chem* **268**: 22265-8.
- Goodner, C. J., Walike, B. C., Koerker, D. J., Ensink, J. W., Brown, A. C., Chideckel, E. W., Palmer, J. & Kalnasy, L. (1977).** Insulin, glucagon, and glucose exhibit synchronous, sustained oscillations in fasting monkeys. *Science* **195**: 177-9.
- Grapengiesser, E. (1993).** Cell photodamage, a potential hazard when measuring cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> with fura-2. *Cell Struct Funct* **18**: 13-7.
- Grapengiesser, E., Gylfe, E. & Hellman, B. (1988).** Glucose-induced oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in the pancreatic beta-cell. *Biochem Biophys Res Commun* **151**: 1299-304.
- Grapengiesser, E., Gylfe, E. & Hellman, B. (1990).** Sulfonylurea mimics the effect of glucose in inducing large amplitude oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in pancreatic beta-cells. *Mol Pharmacol* **37**: 461-7.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. (1985).** A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-50.
- Hedeskov, C. J. (1980).** Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol. Rev.* **60**: 442-509.
- Hellman, B., Abrahamsson, H., Andersson, T., Berggren, P. O., Flatt, P., Gylfe, E. & Hahn, H. J. (1980).** Calcium movements in relation to glucose-stimulated insulin secretion. *Horm Metab Res Suppl* **10**: 122-30.
- Hellman, B., Gylfe, E., Bergsten, P., Grapengiesser, E., Lund, P. E., Berts, A., Tengholm, A., Pipeleers, D. G. & Ling, Z. (1994).** Glucose induces oscillatory Ca<sup>2+</sup> signalling and insulin release in human pancreatic beta cells. *Diabetologia* **37**: 371.
- Hellman, B., Gylfe, E., Bergsten, P., Grapengiesser, E., Lund, P.-E., Saha, S., Berts, A., Dryselius, S., Tengholm, A., Liu, Y.-J. & Eberhardson, M. (1994).** Pulsatile Ca<sup>2+</sup>

signalling and insulin release. In: *Frontiers of Insulin Secretion and Pancreatic B-Cell Research*. P. L. S. Flatt, Smith-Gordon, Nishimura: 221-8.

**Hellman, B., Gylfe, E., Grapengiesser, E., Lund, P. E. & Berts, A. (1992).** Cytoplasmic  $Ca^{2+}$  oscillations in pancreatic beta-cells. *Biochim Biophys Acta* **1113**: 295-305.

**Henquin, J. C. & Lambert, A. E. (1974).** Cationic environment and dynamics of insulin secretion. II. Effect of a high concentration of potassium. *Diabetes* **23**: 933-42.

**Henquin, J. C. & Meissner, H. P. (1984).** Effects of theophylline and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on the membrane potential of mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol Lond* **351**: 595-612.

**Hers, H. G. (1990).** Mechanisms of blood glucose homeostasis. *J Inherit Metab Dis* **13**: 395-410.

**Hess, B. (1979).** The glycolytic oscillator. *J Exp Biol* **81**: 7-14.

**Hess, B. (1997).** Periodic patterns in biochemical reactions. *Q Rev Biophys* **30**: 121-76.

**Hutton, J. C., Sener, A., Herchuelz, A., Atwater, I., Kawazu, S., Boschero, A. C., Somers, G., Devis, G. & Malaisse, W. J. (1980).** Similarities in the stimulus-secretion coupling mechanisms of glucose- and 2-keto acid-induced insulin release. *Endocrinology* **106**: 203-19.

**Islam, M. S., Larsson, O., Nilsson, T. & Berggren, P. O. (1995).** Effects of caffeine on cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  concentration in pancreatic beta-cells are mediated by interaction with ATP-sensitive  $K^{+}$  channels and L-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels but not the ryanodine receptor. *Biochem J* **306**: 679-86.

**Jörns, A., Tiedge, M., Sickel, E. & Lenzen, S. (1996).** Loss of GLUT2 glucose transporter expression in pancreatic beta cells from diabetic Chinese hamsters. *Virchows Arch* **428**: 177-85.

**Kindmark, H., Kohler, M., Arkhammar, P., Efendic, S., Larsson, O., Linder, S., Nilsson, T. & Berggren, P. O. (1994).** Oscillations in cytoplasmic free calcium concentration in human pancreatic islets from subjects with normal and impaired glucose tolerance. *Diabetologia* **37**: 1121-31.

**Kotagal, N., Colca, J. R., Buscetto, D. & McDaniel, M. L. (1985).** Effect of insulin secretagogues and potential modulators of secretion on a plasma membrane ( $Ca^{2+}$  +  $Mg^{2+}$ )-ATPase activity in islets of Langerhans. *Arch. Biochem. Biophys* **238**: 161-9.

- 
- Lang, D. A., Matthews, D. R., Peto, J. & Turner, R. C. (1979).** Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentration in human beings. *N. Engl. J. Med.* **301**: 1023-7.
- Langer, J., Panten, U. & Zielmann, S. (1983).** Effects of alpha-adrenoceptor antagonists on clonidine-induced inhibition of insulin secretion by isolated pancreatic islets. *Br J Pharmacol* **79**: 415-20.
- Lefebvre, P. J., Paolisso, G., Scheen, A. J. & Henquin, J. C. (1987).** Pulsatility of insulin and glucagon release: physiological significance and pharmacological implications. *Diabetologia* **30**: 443-52.
- Lembert, N. & Idahl, L.-A. (1998).** a-Ketoisocaproate is not a true substrate for ATP production by pancreatic b-cell mitochondria. *Diabetes* **47**: 339-44.
- Lenzen, S. (1975).** The immediate insulin secretory response of the isolated perfused rat pancreas to tolbutamide and glucose. *FEBS Lett* **49**: 407-8.
- Lenzen, S. (1978).** Effects of alpha-ketocarboxylic acids and 4-pentenoic acid on insulin secretion from the perfused rat pancreas. *Biochem Pharmacol* **27**: 1321-4.
- Lenzen, S. (1978).** The immediate insulin secretory response of the rat pancreas to glucose compared with tolbutamide and other secretagogues. *Diabetes* **27**: 27-34.
- Lenzen, S., Formanek, H. & Panten, U. (1982).** Signal function of metabolism of neutral amino acids and 2-keto acids for initiation of insulin secretion. *J Biol Chem* **257**: 6631-3.
- Lenzen, S. & Panten, U. (1980).** 2-oxocarboxylic acids and function of pancreatic islets in obese-hyperglycaemic mice. Insulin secretion in relation to  $^{45}\text{Ca}$  uptake and metabolism. *Biochem J* **186**: 135-44.
- Lenzen, S. & Panten, U. (1981).** Effects of pyruvate, L-lactate, and 3-phenylpyruvate on function of ob/ob mouse pancreatic islets: insulin secretion in relation to  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake and metabolism. *Biochem Med* **25**: 366-72.
- Lenzen, S. & Panten, U. (1988).** Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochem Pharmacol* **37**: 371-8.
- Lenzen, S. & Rustenbeck, I. (1991).** Effects of IP<sub>3</sub>, spermine, and Mg<sup>2+</sup> on regulation of Ca<sup>2+</sup> transport by endoplasmic reticulum and mitochondria in permeabilized pancreatic islets. *Diabetes* **40**: 323-6.

- Lenzen, S., Schmidt, W. & Panten, U. (1985).** Transamination of neutral amino acids and 2-keto acids in pancreatic B-cell mitochondria. *J Biol Chem* **260**: 12629-34.
- Lenzen, S., Schmidt, W., Rustenbeck, I. & Panten, U. (1986).** 2-ketoglutarate generation in pancreatic B-cell mitochondria regulates insulin secretory action of amino acids and 2-keto acids. *Biosci Rep* **6**: 163-9.
- Lenzen, S., Tiedge, M. & Panten, U. (1987).** Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinol Copenh* **115**: 21-9.
- Lernmark, A. (1974).** The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia* **10**: 431-8.
- Liu, Y. J., Grapengiesser, E., Gylfe, E. & Hellman, B. (1995).** Glucose induces oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> in pancreatic beta-cells without participation of the thapsigargin-sensitive store. *Cell Calcium* **18**: 165-73.
- Longo, E. A., Tornheim, K., Deeney, J. T., Varnum, B. A., Tillotson, D., Prentki, M. & Corkey, B. E. (1991).** Oscillations in cytosolic free Ca<sup>2+</sup>, oxygen consumption, and insulin secretion in glucose-stimulated rat pancreatic islets. *J Biol Chem* **266**: 9314-9.
- MacDonald, M. J. (1989).** Does glyceraldehyde enter pancreatic islet metabolism via both the triokinase and the glyceraldehyde phosphate dehydrogenase reactions? *Arch. Biochem. Biophys.* **270**: 15-22.
- MacDonald, M. J. & Fahien, L. A. (1988).** Glyceraldehyde phosphate and methyl esters of succinic acid. Two "new" potent insulin secretagogues. *Diabetes* **37**: 997-9.
- Malaisse, W. J., Jijakli, H., Ulusoy, S., Cook, L., Best, L., Vinambres, C., Villanueva Penacarrillo, M. L., Valverde, I. & Sener, A. (1996).** Insulinotropic action of methyl pyruvate: secretory, cationic, and biosynthetic aspects. *Arch Biochem Biophys* **335**: 229-44.
- Malaisse, W. J., Malaisse Lagae, F. & Sener, A. (1981).** Presence of fructose-6-phosphate,2-kinase in pancreatic islets. *FEBS Lett* **135**: 203-6.
- Martin, F., Sanchez Andres, J. V. & Soria, B. (1995).** Slow [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations induced by ketoisocaproate in single mouse pancreatic islets. *Diabetes* **44**: 300-5.
- Martin, F. & Soria, B. (1995).** Amino acid-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in single mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol Lond* **486**: 361-71.
- Martin, F. & Soria, B. (1996).** Glucose-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in single human pancreatic islets. *Cell Calcium* **20**: 409-14.

- Matthews, D. R., Naylor, B. A., Burnett, M., Ward, G. M. & Turner, R. C. (1983).** Pulsatile insulin has greater hypoglycemic effect than continuous delivery. *Diabetes* **32**: 617-21.
- Mears, W. E., Lam, V. & Rice, S. A. (1995).** Identification of nuclear and nucleolar localization signals in the herpes simplex virus regulatory protein ICP27. *J Virol* **69**: 935-47.
- Mertz, R. J., Worley, J. F., Spencer, B., Johnson, J. H. & Dukes, I. D. (1996).** Activation of stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells by specific products of glucose metabolism. Evidence for privileged signaling by glycolysis. *J Biol Chem* **271**: 4838-45.
- Miura, Y., Henquin, J. C. & Gilon, P. (1997).** Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores stimulates Ca<sup>2+</sup> entry in mouse pancreatic beta-cells by both direct and indirect mechanisms. *J Physiol Lond* **503**: 387-98.
- Morgan, N. G., Chan, S. L. F., Lacey, R. J. & Brown, C. A. (1994).** Pharmacology and molecular biology of islet adrenoceptor. In: *Frontiers of Insulin Secretion and Pancreatic B-Cell Research*. P. Flatt and S. Lenzen, Smith-Gordon, Nishimura: 359-68.
- Nilsson, T., Schultz, V., Berggren, P. O., Corkey, B. E. & Tornheim, K. (1996).** Temporal patterns of changes in ATP/ADP ratio, glucose 6-phosphate and cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> in glucose-stimulated pancreatic beta-cells. *Biochem J* **314**: 91-4.
- O'Rahilly, S., Turner, R. C. & Matthews, D. R. (1988).** Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* **318**: 1225-30.
- Panten, U., Kriegstein, E. V., Poser, W., Schönborn, J. & Hasselblatt, A. (1972).** Effects of L-leucine and  $\alpha$ -Ketoisocaproic acid upon insulin release and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS Lett.* **20**: 225-8.
- Panten, U., Schwanstecher, M. & Schwanstecher, C. (1996).** Sulfonylurea receptors and mechanism of sulfonylurea action. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **104**: 1-9.
- Pershadsingh, H. A., McDaniel, M. L., Landt, M., Bry, C. G., Lacey, P. E. & McDonald, J. M. (1980).** Ca<sup>2+</sup>-activated ATPase and ATP-dependent calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup> transport in islet cell plasma membrane. *Nature* **288**: 492-5.

- Polonsky, K. S., Given, B. D., Hirsch, L. J., Tillil, H., Shapiro, E. T., Beebe, C., Frank, B. H., Galloway, J. A. & VanCauter, E. (1988).** Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **318**: 1231-9.
- Porte, D., Jr. & Robertson, R. P. (1973).** Control of insulin secretion by catecholamines, stress, and the sympathetic nervous system. *Fed Proc* **32**: 1792-6.
- Pralong, W. F., Bartley, C. & Wollheim, C. B. (1990).** Single islet beta-cell stimulation by nutrients: relationship between pyridine nucleotides, cytosolic Ca<sup>2+</sup> and secretion. *Embo J* **9**: 53-60.
- Prentki, M., Glennon, M. C., Thomas, A. P., Morris, R. L., Matschinsky, F. M. & Corkey, B. E. (1988).** Cell-specific patterns of oscillating free Ca<sup>2+</sup> in carbamylcholine-stimulated insulinoma cells. *J Biol Chem* **263**: 11044-7.
- Prentki, M. & Matschinsky, F. M. (1987).** Ca<sup>2+</sup>, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* **67**: 1185-248.
- Probst, I., Quentmeier, A., Schweickhardt, C. & Unthan Fechner, K. (1989).** Stimulation by insulin of glycolysis in cultured hepatocytes is attenuated by extracellular ATP and puromycin through purine-dependent inhibition of phosphofructokinase 2 activation. *Eur J Biochem* **182**: 387-93.
- Ristow, M., Vorgerd, M., Mohlig, M., Schatz, H. & Pfeiffer, A. (1997).** Deficiency of phosphofructo-1-kinase/muscle subtype in humans impairs insulin secretion and causes insulin resistance. *J Clin Invest* **100**: 2833-41.
- Roe, M. W., Mertz, R. J., Lancaster, M. E., Worley, J. F. r. & Dukes, I. D. (1994).** Thapsigargin inhibits the glucose-induced decrease of intracellular Ca<sup>2+</sup> in mouse islets of Langerhans. *Am J Physiol* **266**: 36.
- Rosario, L. M., Atwater, I. & Scott, A. M. (1986).** Pulsatile insulin release and electrical activity from single ob/ob mouse islets of Langerhans. *Adv Exp Med Biol* **211**: 413-25.
- Santos, R. M., Rosario, L. M., Nadal, A., Garcia Sancho, J., Soria, B. & Valdeolmillos, M. (1991).** Widespread synchronous [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch* **418**: 417-22.
- Schwanstecher, C., Meyer, M., Schwanstecher, M. & Panten, U. (1998).** Interaction of N-benzoyl-D-phenylalanine and related compounds with the sulphonylurea receptor in the β-cell. *Br. J. Pharmacol.* **123**



- Sharp, G. W. (1996).** Mechanisms of inhibition of insulin release. *Am J Physiol* **271**: C1781-99.
- Shinkai, H., Toi, K., Kumashiro, I., Seto, Y., Fukuma, M., Dan, K. & Toyoshima, S. (1988).** N-acylphenylalanines and related compounds. A new class of oral hypoglycemic agents. *J Med Chem* **31**: 2092-7.
- Siegel, E. G., Wollheim, C. B., Renold, A. E. & Sharp, G. W. G. (1980).** Evidence for the involvement of Na/Ca exchange in glucose-induced insulin release from rat pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* **66**: 996-1003.
- Siegel, E. G., Wollheim, C. B., Sharp, G. W., Herberg, L. & Renold, A. E. (1980).** Role of Ca<sup>2+</sup> in impaired insulin release from islets of diabetic (C57BL/KsJ-db/db) mice. *Am J Physiol* **239**: E132-8.
- Stagner, J. I. & Samols, E. (1985).** Perturbation of insulin oscillations by nerve blockade in the in vitro canine pancreas. *Am J Physiol* **248**: 36.
- Theler, J. M., Mollard, P., Guerineau, N., Vacher, P., Pralong, W. F., Schlegel, W. & Wollheim, C. B. (1992).** Video imaging of cytosolic Ca<sup>2+</sup> in pancreatic beta-cells stimulated by glucose, carbachol, and ATP. *J Biol Chem* **267**: 18110-7.
- Tornheim, K. (1988).** Fructose 2,6-bisphosphate and glycolytic oscillations in skeletal muscle extracts. *J Biol Chem* **263**: 2619-24.
- Tornheim, K. (1997).** Are metabolic oscillations responsible for normal oscillatory insulin secretion? *Diabetes* **46**: 1375-80.
- Tsien, R. Y. (1981).** A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* **290**: 527-8.
- Tucker, S. J., Gribble, F. M., Zhao, C., Trapp, S. & Ashcroft, F. M. (1997).** Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* **387**: 179-83.
- Turtle, J. R. & Kipnis, D. M. (1967).** An adrenergic receptor mechanism for the control of cyclic 3'5' adenosine monophosphate synthesis in tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **28**: 797-802.
- Valdeolillos, M., Santos, R. M., Contreras, D., Soria, B. & Rosario, L. M. (1989).** Glucose-induced oscillations of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett* **259**: 19-23.

- 
- Van Schaftingen, E., Jett, M. F., Hue, L. & Hers, H. G. (1981).** Control of liver 6-phosphofructokinase by fructose 2,6-bisphosphate and other effectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 3483-6.
- Vierling, W. & Stampfl, A. (1994).** Magnesium-dependent calcium efflux in mammalian heart muscle. *Cell Calcium* **15**: 175-82.
- Waldhäusl, W. & Lenzen, S. (1998).** Kohlenhydrate, endokrines Pankreas, Diabetes. In: Pathophysiologie. Molekulare und zelluläre Pathomechanismen. G. Wick, S. Schwarz, M. Peterlik and Schauenstein. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag: Im Druck.
- Weigle, D. S. (1987).** Pulsatile secretion of fuel-regulatory hormones. *Diabetes* **36**: 764-75.
- Westerlund, J., Gylfe, E. & Bergsten, P. (1997).** Pulsatile insulin release from pancreatic islets with nonoscillatory elevation of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>. *J Clin Invest* **100**: 2547-51.
- Wollheim, C. B. & Sharp, G. W. (1981).** Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev* **61**: 914-73.
- Yaney, G. C., Schultz, V., Cunningham, B. A., Dunaway, G. A., Corkey, B. E. & Tornheim, K. (1995).** Phosphofructokinase isozymes in pancreatic islets and clonal beta-cells (INS-1). *Diabetes* **44**: 1285-9.
- Züнкler, B. J., Lenzen, S., Manner, K., Panten, U. & Trube, G. (1988).** Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP-regulated K<sup>+</sup> currents in pancreatic B-cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **337**: 225-30.

## Lebenslauf

Name: Thomas Peckmann

Geboren am 09.11.1963 in Langenhagen

Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulische Bildung

- 1970 - 1974 Besuch der Grundschule Bonner Str., Hannover und der Grundschule Ronnenberg
- 1974 - 1976 Besuch des Matthias-Claudius-Gymnasiums, Gehrden
- 1976 - 1977 Besuch der Orientierungsstufe Ronnenberg
- 1977 - 1983 Besuch der Sekundarstufen I und II am Matthias-Claudius-Gymnasium, Gehrden Abschluß : Abitur

### Studium

- 1983 - 1992 Studium der Chemie an der Universität Hannover, Abschluß : Diplom  
Diplomarbeit „Sehr Gut“; Gesamtnote „Gut“
- 1992 - 1994 Studium der Physik, ohne Abschluß
- 1994 - 1998 Promotionsstudium am Institut für Klinische Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover, Abschluß voraussichtlich Herbst 1998
- Seit 01.01.1999 Mitarbeiter der Firma DESITIN Arzneimittel GmbH, Hamburg

11/94 - 8/95 Selbständiger Programmierer

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht unter:

**Peckmann, T., Lenzen, S. (1997).** Glykolytischer Ursprung von  $\text{Ca}^{2+}$  Oszillationen im Zytoplasma von isolierten Pankreasinseln der Maus.

*Diabetes und Stoffwechsel* 6, Suppl 1, 64,