

Diplomarbeit

Die Rolle von STIM1 und Orai1 für die Glukose induzierte Insulinsekretion aus beta- Zellen

eingereicht von

Jan-Werner Ramming
Mat.Nr.: 0733118

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der gesamten Heilkunde (Dr. med. univ.)

an der
Medizinischen Universität Graz



Medizinische Universität Graz

ausgeführt am
Institut für Molekularbiologie und Biochemie

unter der Anleitung von
Assoz.Prof. PD Dr. Roland Malli
Univ.-Prof. Dr. Wolfgang F. Graier

Graz, am 02.09.2010

Jan-Werner Ramming

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 02.09.2010

Jan-Werner Ramming

Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Assoz.Prof. PD Dr. Roland Malli für die zahllosen Erklärungen, Hilfestellungen, kritischen und vor allem konstruktiven Ratschläge und die Geduld, die er mit mir hatte. Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolfgang F. Graier gilt mein Dank für die nützlichen Ratschläge zu Software und die spannenden konstruktiven Gespräche, die oft weit über den Tellerrand der Arbeit hinaus gingen.

Vielen Dank auch allen Mitarbeitern der Forschungseinheit für molekulare und zelluläre Physiologie: Muhammad Rizwan Alam, MSc.; Dr. Alexander Bondarenko; Mag. pharm. Stefan Dobersberger; Dr.ⁱⁿ Ismene Fertschai; Muhammad Jadoon Khan, MSc.; Dr.ⁱⁿ Shamim Nghadi; Anna Schreilechner und Dr. Markus Waldeck-Weiermaier dafür, dass sie mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und ich großzügig von ihrem Wissen profitieren durfte.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden bedanken, die mich bei dieser Arbeit durch Lektüre, Anregungen Verbesserungsvorschläge und Ablenkung unterstützt haben.

Inhalt

Danksagung	III
Abkürzungen	VII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XI
Zusammenfassung.....	XII
Abstract.....	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Prinzip der Glukosehomöostase	3
1.1.1 Histologie.....	3
1.1.2 Modell der glukoseabhängigen Insulinsekretion	4
1.1.3 Molekulare Wirkmechanismen von Insulin.....	13
1.2 $[Ca]_i$ Regulation.....	16
1.3 Arbeitshypothese	18
1.4 Wissenschaftlicher Hintergrund – putative molekulare Mechanismen	19
1.5 Ziel dieser Arbeit	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Chemikalien	21
2.2 Zellkultur.....	21
2.3 Transfektion	22
2.4 RNA Interference (RNAi, RNA silencing)	24
2.5 Mikroskopie	24
2.5.1 Konfokale Mikroskopie.....	24
2.5.2 Färbung von Mitochondrien mit Mitotracker green.....	25
2.5.3 FRET-Mikroskopie	25
2.5.4 ATP-Messung.....	27
2.6 Glukosestimulation vor der Insulinbestimmung	28
2.7 Insulin-Elisa für Ratten (Mercodia)	30
2.8 Normalisierung der Insulinproduktion	30
2.8.1 Photographie	30
2.8.2 Membranoberfläche.....	31
2.8.3 Zellzahl	31

2.8.4	Proteinbestimmung mittels Bradford.....	31
2.8.5	MTT	32
2.9	Statistik.....	33
3	Ergebnisse	33
3.1	Bestimmung der Reaktion von INS-1 Zellen auf Glukose und Validierung der Methodik.....	33
3.1.1	Die Stimulation von INS-1 Zellen mit Glukose führt zu einem signifikanten Anstieg der mitochondrialen ATP-Konzentration in einzelnen INS-1 Zellen	34
3.1.2	Der Anstieg der mitochondrialen ATP Konzentration erfolgt etwa doppelt so schnell, wie sein Abfall.....	35
3.1.3	Mechanische Reizung erhöht $[ATP]_{mito}$ in INS-1 Zellen	36
3.1.4	unter HBSS mit 0mM Glukose ändert sich die Morphologie der Zellen	37
3.1.5	Hohe Glukosekonzentration lässt Mitochondrien fragmentieren.....	38
3.1.6	Stimulation von INS-1 Zellen mit 16mM Glukose über zwei Stunden steigert signifikant die Insulinproduktion.....	40
3.1.7	Fehlende Waschschrte verhindern die Registrierung der glukoseabhängigen Insulinsekretion	41
3.1.8	Zellanzahl, MTT und die Messung der Membranfläche verhalten sich proportional zur Konfluenz	42
3.1.9	Die [Glukose] steht zur Insulinproduktion in einer Konzentrations- Wirkungs-Beziehung.	44
3.1.10	Die stimulierte Insulinsekretion nimmt über die Zeit zu.....	45
3.1.11	MTT Ergebnisse sind abhängig von der [Glukose]	46
3.1.12	Auswahl des Normalisierungsverfahrens.....	46
3.2	Variation des Expressionslevels von STIM1 und Orai1.....	46
3.2.1	Subzelluläre Lokalisation von STIM1 und Orai1 in INS-1 Zellen	46
3.2.2	Glukosestimulation führt zu transienter subplasmalemaler STIM Aggregation.....	47
3.2.3	Eine Transfektionsdauer von zwei Tagen ist zu lange und liefert keine brauchbaren Ergebnisse	48
3.2.4	Sowohl STIM1 Knockdown als auch STIM1/Orai1 Überexpression führt zu verringerter GDIS	49

4	Zusammenfassende Diskussion	52
4.1	Glukose bedingt mitochondrialen [ATP]-Anstieg	52
4.2	Der Anstieg der mitochondrialen ATP Konzentration geschieht schneller als ihr Abfall	52
4.3	Mechanische Reizung führt zu gesteigerter ATP-Produktion	53
4.4	Zusatz von HBSS-Medium führt zum Anhaften der INS-1 Zellen am Wellboden.....	53
4.5	Mitochondrienfragmentierung durch Glukose.....	53
4.6	INS-1 Zellen verhalten sich entsprechend dem Modell der glukoseabhängigen Insulinsekretion	54
4.7	Normalisierung	54
4.8	Veränderung in der STIM Expression verringert GDIS.....	55
4.9	Therapeutische Ansätze.....	55
5	Referenz.....	XIV

Abkürzungen

[...]	Konzentration
[Ca ²⁺] _e	extrazelluläre Kalziumionenkonzentration
[Ca ²⁺] _i	zytoplasmatische Kalziumionenkonzentration
μ	mykro (10 ⁻⁶)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon, Kortikotropin
ADP	Adenosin-5-diphosphat
AGE	<i>advanced glycation endproducts</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5-triphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Ca ²⁺	Kalziumion
cAMP	zyklisches Adenosin 3',5'-monophosphat
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CICR	<i>calcium induced calcium release</i>
CRACM	<i>calcium release activated calcium modulator, Orai</i>
Da	Dalton
DAG	1,2-Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagles medium</i>
DPP-4	Dipeptidyl-Peptidase 4
dsRNA	<i>double stranded RNA</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD / FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FRET	<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
GDIS	<i>Glucose-Dependent Insulin Secretion = GSIS</i> <i>(glucose stimulated insulin secretion)</i>
GH	<i>growth hormone</i> , Somatotropin
GIP	<i>gastric inhibitory peptide</i>
GLP	<i>glucagon like peptide</i>
GLUT	GLUKose Transporter

HBSS	<i>Hank's buffered salt solution/HEPES balanced salt solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRS	Insulin Receptor Substrate
k	kilo (10 ³)
K _{ATP}	ATP abhängiger Kaliumkanal
LPL	Lipoproteinlipase
m	milli (10 ⁻³)
M	mol
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein</i>
Min	Minute
Mm.	Skelettmuskulatur
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	nano (10 ⁻⁹)
NAD / NADH/H ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ <i>exchanger</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Pyruvatcarboxylase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA/C	Proteinkinase A/C
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran, Zellmembran
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
rER	raues ER
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAM-Domäne	<i>Sterile a motif</i>

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNARE	<i>soluble N-ethyl-maleimide sensitive fusion protein attachment protein receptors</i>
SOC	<i>Store Operated Channel</i>
SOCE	<i>Store Operated Calcium Entry</i>
SR	Sarkoplamatisches Retikulum
STIM	<i>Stromal interacting molecule</i>
SUR	Sulfonylharnstoff(sulfonylurea)Rezeptor
TAG	Triacylglycerol
TRPC	<i>Transient receptor potential</i> Ionenkanal der canonical Gruppe
VDCC	<i>Voltage Dependent Calcium Channel</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
Δ	Änderung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau und Lage des Pankreas	4
Abbildung 2: Schema des Glukosemetabolismus	6
Abbildung 3: „kiss and run“	8
Abbildung 4: G-Proteinsignalwege in der β -Zelle	10
Abbildung 5: Glukoseinduzierte Insulinsekretion	11
Abbildung 6: A: Insulinantwort auf abrupten, hohen Glukosereiz, B: physiologischer Anstieg der $[\text{Insulin}]_{\text{Blut}}$ infolge einer Mahlzeit....	13
Abbildung 7: Prozesse der Ca^{2+} -Regulation.....	16
Abbildung 8: Prinzip des SOCE.....	18
Abbildung 9: Hypothetische Beeinflussung der GDIS durch SOCE	20
Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskop mit Ausstattung	26
Abbildung 11: ε -Untereinheit mit ATP	27
Abbildung 12: Die Fluorophoren von ATeam werden über die ε Untereinheit der ATP-Synthase verknüpft	27
Abbildung 13: Stimulation mit $[\text{Glucose}] \geq 10\text{mM}$ zeigt einen deutlichen mitochondrialen $[\text{ATP}]$ -Anstieg. Bei 3mM ist kein Effekt zu sehen.	34
Abbildung 14: Anstieg und Abfall der $[\text{ATP}]_{\text{mito}}$ mit Trendlinien und deren Funktion	36
Abbildung 15: Nach Erhöhung des Pufferflusses zeigt sich ein deutlicher Anstieg der $[\text{ATP}]_{\text{mito}}$	36
Abbildung 16: a: in INS-Kulturmedium; b: nach 2h HBSS 0mM Glukose	37
Abbildung 17: a: vor; b: nach 2h mit 10mM Glukose in HBSS	37
Abbildung 18: Mitochondrien mit 10mM (a) und ohne Glukose (b) nach 8 Minuten	39
Abbildung 19: Die mit 16mM Glucose über 2 Stunden stimulierten Zellen weisen eine signifikant höhere Insulinproduktion auf	40
Abbildung 20: auf MTT normalisierte Ergebnisse und reine Absorptionswerte. Bei den normalisierten Werten lässt sich kein Unterschied feststellen.....	41
Abbildung 21: Bei Stimulation mit verschiedenen $[\text{Glucose}]$ ist bei ungewaschenen Zellkulturen kein Zusammenhang mit der Insulinsekretion festzustellen, lediglich eine zeitabhängige Steigerung.	42
Abbildung 22: Die $[\text{Insulin}]$ nach einer Minute beträgt bereits $>10 \text{ ng}/10^6 \text{ Zellen}$. .	42

Abbildung 23: Messung der Konfluenz über Graustufen und Grenzwert.....	43
Abbildung 24: links: steigende Konfluenz ist proportional zu Zellanzahl und MTT-Umsatz. rechts: Die unstimulierten Zellen zeigen keine Insulinproduktion, die der stimulierten wächst mit steigender Konfluenz.	44
Abbildung 25: Dosis-Wirkung Beziehung zwischen [Glukose] und Insulinsekretion	45
Abbildung 26: Zeitabhängige Insulinsekretion unter Glukosestimulation.....	45
Abbildung 27: MTT-Ergebnisse bei 0 und 16 mM Glukose im Medium.....	46
Abbildung 28: STIM-YFP und Orai-CFP im konfokalen Fluoreszenzmikroskop...	47
Abbildung 29: INS-1 Zelle bei t=0, 2, 5 min nach Pufferwechsel von 0 auf 16mM Glukose, transient transfiziert mit pESTIM-YFP.....	48
Abbildung 30: Keine Reaktion auf Glukose bei Transfektion.....	49
Abbildung 31: STIM1 & Orai1 Überexpression sowie STIM1 Knockdown verringern die GDIS.....	50
Abbildung 32: Die Transfektion mit rat STIM1 siRNA senkt die Insulinsekretion im Vergleich zur Kontrolle signifikant.	51
Abbildung 33: Bei STIM Überexpression ist die Insulinproduktion nicht signifikant reduziert.	51
Abbildung 34: Immunhistochemie mit Anti-Ca _v 1.2 Antikörper im Ratten-Pankreas.	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelltypen in Langerhans-Inseln.....	3
Tabelle 2: Bilanz der beim Glukosemetabolismus produzierten ATP.....	6
Tabelle 3: G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit ihren Liganden und Signalwegen	10
Tabelle 4: Zelluläre Effekte der Insulinrezeptoraktivierung	15
Tabelle 5: Protokoll Transfast für INS.....	23
Tabelle 6: Protokoll Glukosestimulation und Mercodia ELISA.....	29
Tabelle 7: Protokoll Bradford	32
Tabelle 8: Protokoll MTT-Assay	33
Tabelle 9: Unterschiedliche Reaktion verschiedener Zellen auf mehrfachen Glukosereiz.	35

Zusammenfassung

Die Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas ist abhängig von der extrazellulären Glukosekonzentration. Der letzte Schritt des Signalwegs von Glukosemessung bis Insulinausschüttung ist ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellularraum. Auch die Proteine STIM1 und Orai1 führen über den Prozess des *store operated calcium entry* (SOCE) zu einem Einstrom dieser Ionen. Das Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen dem speicherregulierten Kalziumeinstrom und der Insulinsekretion existiert. Dazu wurden eine Kultur von Pankreaskarzinomzellen aus Ratten (INS-1) gewählt und diese u.a. mit fluoreszenzmikroskopischen Techniken charakterisiert. Es wurden diverse morphologische Änderungen der Zellen gezeigt. Ein neues Verfahren diente der Messung der glukoseabhängigen ATP-Produktion in Mitochondrien mittels FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*). Weiterhin wurden molekularbiologische Messungen zur Bestimmung der abgegebenen Insulinmenge angewandt und der Mercodia Insulin ELISA für die Messungen in kultivierten Zellen adaptiert. Ferner wurden zellbiologisch die Expressionslevel der Proteine mit Überexpression und Knockdown von STIM1 und Orai1 verändert.

Diverse Methoden zur Normalisierung der Insulinproduktion wurden verglichen, wobei sich die durchschnittliche Zelldichte am besten bewährte. Schließlich zeigte sich entgegen den Erwartungen sowohl bei Überexpression von STIM1 und Orai1, als auch bei STIM1 Knockdown eine signifikante Reduktion der Insulinsekretion.

Abstract

THE ROLE OF STIM1 AND ORAI1 FOR THE GLUCOSE INDUCED INSULIN SECRETION (GDIS) IN PANCREATIC BETA-CELLS

Insulin secretion from pancreatic beta cells is dependent on the extracellular concentration of glucose. The final step of the signaling pathway from glucose level determination to the insulin secretion is an entry of Ca^{2+} -ions from the extracellular space. The proteins STIM1 and Orai1 conduct this influx by store operated calcium entry (SOCE). The aim of this study was to figure out a correlation between SOCE and insulin secretion. For this purpose a cell line of pancreatic carcinoma cells from rat (INS-1) was selected and characterized inter alia using fluorescence microscopy. Several morphological changes of the cells were shown and a new method in FRET-microscopy was used measuring the glucose dependent ATP production in mitochondria. Furthermore, molecular biologic measurements were performed to determine the secreted insulin level and the Mercodia insulin ELISA was adapted for cell culture measurements. Moreover, using cell biological technique, the expression level of STIM1 and Orai1 was varied by overexpression and knockdown of these proteins. Numerous methods of normalizing insulin production were compared and the average cell count proved itself in practice. Contrary to expectations, finally both over expression of STIM1 and Orai1 and STIM1 knockdown showed a significant decrease of insulin secretion.

1 Einleitung

Nach Hochrechnungen der österreichischen Gesundheitsbefragung 2006/2007 der Statistik Austria leiden von 6.991.900 Österreichern 415.400 unter Diabetes mellitus. Das entspricht einer Prävalenz von 5,9% [1], wobei die Dunkelziffer sehr hoch ist. Gemäß der KORA^a Studie in Deutschland liegt sie für manifesten Diabetes mellitus bei etwa 50%. Insgesamt leiden 16% der Bevölkerung entweder an Diabetes oder gestörter Glukosetoleranz^b (IGT) [2] welche damit die häufigste metabolischen Störung darstellt [3]. Die Krankheit hat sowohl große medizinische als auch ökonomische Bedeutung. Nach der KoDiM^c Studie in Hessen summierten sich die direkten und indirekten Kosten durch Diabetes im Jahr 2001 auf 59,8 Mrd. €. Das entspricht nach Angaben des Statistischen Bundesamtes 2,8% des Bruttoinlandsproduktes in diesem Jahr (2113,16 Mrd. €) [4].

Diese Zahlen sollen die enorme Relevanz verdeutlichen, welche Diabetes mellitus für das Gesundheitssystem, die Ökonomie und darüber hinaus hat^d. Folglich ist die detaillierte Aufklärung der physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen dieser Erkrankung obligat. Schließlich können auch andere Krankheitsbilder Störungen der Blutglukoseregulation verursachen. Man denke etwa an Hyperinsulinismus, Laktatazidose oder Fehldosierung von Arzneimitteln – insbesondere von Insulin.

Das Verständnis der Pathogenese von Diabetes mellitus Typ 2 (DM2)^e wird ständig umfassender und komplexer. Im Wesentlichen setzt sich das Krankheitsbild aus der Insulinresistenz von Skelettmuskulatur und Fettgewebe, einer gestörten β -Zell-Funktion, sowie einem gestörten hepatischen Fett- und Glukosemetabolismus zusammen. Außerdem ist ein enger Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom bekannt. Dabei herrscht ein erhöhtes Angebot an Lipiden, die die Speicherkapazitäten von Fettgewebe und Leber füllen und durch die Skelettmuskulatur wegen Inaktivität nicht verbrannt werden (s.g.

^a Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg

^b Impaired Glucose Tolerance (erhöhte $[Glukose]_{Blut(kapillär)} \geq 7,8mM, \leq 11,1mM$ 2 h nach Aufnahme von 75g Glukose siehe auch [2])

^c Kosten des Diabetes Mellitus

^d weitere ausführliche Informationen zur globalen Bedeutung von Diabetes mellitus finden sich im Diabetes Atlas der International Diabetes Federation (IDF), Brüssel

^e Diabetes mellitus in den folgenden Ausführungen bezieht sich stets auf den DM2.

mitochondriale Dysfunktion). Dazu kommt die Schädigung der β -Zellen durch hohe Blutzuckerspiegel (Glukotoxizität) und Lipidablagerungen (Lipotoxizität) [5].

Die Entstehung von Komplikationen in Folge chronisch erhöhter Blutzuckerspiegel hat seinen molekularen Ursprung unter anderem in der Entstehung von s.g. „*advanced glycation endproducts*“ (AGE). Glukose stellt ein relativ reaktives Molekül dar und reagiert über die Bildung einer Schiff'schen Base und die Amadori-Umlagerung mit den Amino-Gruppen von Proteinen zu Maillard-Komplexen. Dies geschieht nichtenzymatisch und über Tage, sodass vorwiegend langlebige Proteine^a betroffen sind und geschädigt werden [6,7]. Auf Details kann im Rahmen dieser Arbeit leider nicht eingegangen werden.

Die enorme Prävalenz in der Bevölkerung lässt auch auf eine breite genetische Disposition schließen. Das heißt, aus evolutionärer Sicht, dass diese genetische Ausstattung, die heute zur Erkrankung so vieler Menschen führt, früher einmal einen Überlebensvorteil geboten haben muss. Nach der „*Thrifty Gene*“ Hypothese besteht der Vorteil dieser Menschen darin, dass sie in Zeiten inkonstanter Nahrungsverfügbarkeit in Phasen ausreichenden Nahrungsangebots mehr Nährstoffe einspeichern konnten und so für Hungerperioden besser gerüstet waren [8]. Diese guten „Futterverwerter“ haben angeblich von der Insulinresistenz profitiert, da sie bei Aufnahme von Nahrung mit niedrigem glykämischen Index^b eine starke anabole Stoffwechselreaktion hatten [5]. Das ist besonders bei Völkern mit einer vorwiegend aus Fleisch bestehenden Ernährung wichtig, wie es etwa bei den Inuit der Fall ist. Sie sind ein gutes Beispiel dafür, dass für unsere Ernährung nur sehr geringe Mengen an Kohlenhydraten essentiell sind.

Der Unterschied unserer modernen Ernährung im Vergleich zu der unserer Vorfahren, die wesentlich länger Zeit hatten, sich an ihre Ernährungsgewohnheiten anzupassen, liegt in deren phasenweiser Ernährung (abhängig von der Verfügbarkeit wurde vornehmlich Fleisch verzehrt) mit längeren Hungerperioden. Der Mensch ist also grundsätzlich an den Verzehr unterschiedlichster Nahrung gut angepasst. Nach [9] unterschied sich die paläolithische Ernährung anteilig im Wesentlichen dadurch, dass sich 15% der Energiebereitstellung von Eiweiß hin zu Fetten verschob. Die Aufnahme von Kohlenhydraten, die man u.a. für die Entstehung des Diabetes mellitus verantwortlich machen könnte, blieb in etwa gleich (45%). Ein weiterer Unterschied liegt in der Dichte an

^a wie etwa Hämoglobin, dessen glykierte Form (HbA_{1c}) als Marker für die chronische Hyperglykämie genutzt wird

^b beschreibt wie stark ein Nahrungsmittel den Blutzuckerspiegel steigert

Mikronährstoffen (z.B. Vitaminen) die in den heutigen Hochleistungsnahrungsmitteln in geringerer Menge vorkommen (abgesehen von angereicherten Lebensmitteln). Wichtig für unsere moderne Ernährung war die Einführung der Landwirtschaft vor 8.000-10.000 Jahren, wodurch sich die Ernährung in Richtung der vegetabilen Lebensmittel verschob. Ab diesem Zeitpunkt profitierten die Menschen folglich nicht mehr von ihrer Insulinresistenz [5].

1.1 Prinzip der Glukosehomöostase

Die Konzentration an D-Glukose im Blut ($[Glukose]_{Blut}$) von Säugetieren unterliegt einer komplexen Regulation. Die Hormone Glukagon, Cortisol, Adrenalin und Noradrenalin sowie die alimentäre Aufnahme bewirken einen Anstieg des Blutzuckerspiegels, während das Hormon Insulin die $[Glukose]_{Blut}$ rasch senken kann. Insulin wird in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse produziert und bei Bedarf ans Blut abgegeben. Da der blutglukosesenkende Effekt des Insulins nicht redundant ausgelegt ist, führt sein Ausfall häufig zu einer Pathologie - dem Insulinmangel bzw. Diabetes mellitus.

1.1.1 Histologie

Die β -Zellen sind Bestandteile der so genannten Langerhans-Inseln (siehe Abbildung 1). Diese Zellgruppen von jeweils 2.000-3.000 Zellen durchmessen etwa 100-200 μm und repräsentieren den endokrinen Anteil des Pankreas. Sie sind nach ihrem Entdecker Paul Langerhans (1869) benannt. Jeder Mensch besitzt etwa 1-2 Millionen Inseln, die 1-3% an Masse des Pankreas ausmachen. Sie konzentrieren sich im Pankreasschwanz und bestehen jeweils aus 4 verschiedenen Zelltypen mit spezifischen Funktionen [10]:

	Anteil am endokrinen Pankreasgewebe	Produkt
α -Zellen	20%	Glukagon
β -Zellen	70%	Insulin
δ -Zellen	10%	Somatostatin
PP-Zellen	1-2%	Pankreatisches Polypeptid

Tabelle 1: Zelltypen in Langerhans-Inseln [10]

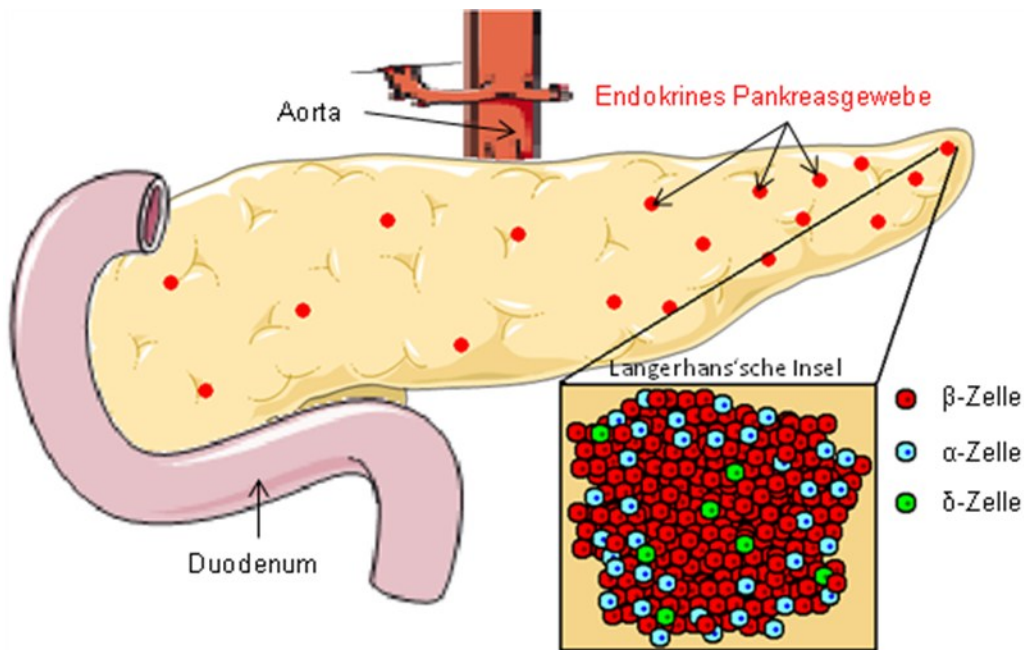


Abbildung 1: Aufbau und Lage des Pankreas. Es liegt retroperitoneal im mittleren Oberbauch eng mit Duodenum und Aorta vergesellschaftet. In den Langerhans'schen Inseln finden sich endokrin aktive Zelltypen in unterschiedlicher Lokalisation (vgl. Tabelle 1). (Figure was produced using Servier Medical Art)

1.1.2 Modell der glukoseabhängigen Insulinsekretion

1.1.2.1 Insulinbiosynthese

Das wirksame Peptidhormon Insulin mit einem Molekulargewicht von 5,8 kDa besteht aus 2 Aminosäureketten. Die A-Kette, die aus 21 Aminosäuren (AS) aufgebaut ist, ist mit der B-Kette (30 AS) mittels zweier Disulfidbrücken verknüpft. Eine dritte Disulfidbrücke innerhalb der A-Kette stabilisiert die Tertiärstruktur dieses Peptidhormons.

Die Synthese beginnt mit der Transkription der mRNA vom Insulingen auf Chromosom 11. Die Translation im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) liefert das Prä-Proinsulin bestehend aus (von N- nach C-terminal) der Signalsequenz (24 AS), der B-Kette gefolgt vom C-Peptid^a (35 AS) und schließlich der A-Kette. Das Signalpeptid dient dem gezielten Transport des Moleküls in das Lumen des rER und wird dort abgespalten, wodurch Proinsulin entsteht. Die Reifung während des Transports via Golgi-Apparat und β -Granula umfasst das Ausschneiden des C-Peptids sowie die Abspaltung von zwei c-terminalen Argininresten der B-Kette durch die Carboxypeptidase E, wodurch das fertige

^a Connecting peptide

Insulin entsteht, als Komplex mit Zinkionen kristallisiert und so länger in den Granula gespeichert werden kann [11,12].

1.1.2.2 Insulinausschüttung

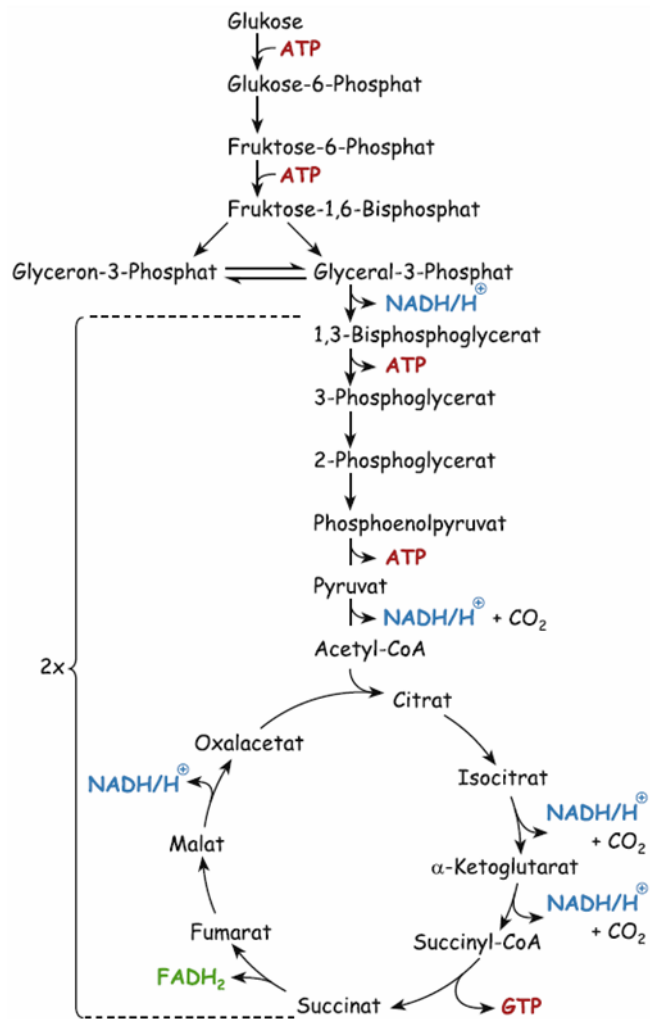
1.1.2.2.1 grundsätzlicher Mechanismus der Insulinsekretion

Zur Messung der $[\text{Glukose}]_{\text{Blut}}$ verfügt die β -Zelle über insulinunabhängige Glukosetransportproteine (GLUT 2) mit hoher Durchsatzgeschwindigkeit (Michaelis-Menten-Konstante (K_M) etwa 40mmol/l) und geringer Affinität. So wird erreicht, dass die zelluläre Glukoseaufnahme stets proportional zur $[\text{Glukose}]_{\text{Blut}}$ ist und die Insulinsekretion in Abhängigkeit von dieser erfolgen kann. Die Glukose wird anschließend durch die Glukokinase zu Glukose-6-phosphat phosphoryliert, was die geschwindigkeitsbestimmende Schlüsselreaktion der Glykolyse darstellt. Über den weiteren Glukosestoffwechsel entsteht Pyruvat, welches in die Mitochondrien transportiert, zu Acetyl-CoA decarboxyliert und in den Zitratzyklus eingespeist wird. Die dort produzierten Reduktionsäquivalente ($\text{NADH}/\text{H}^{+a}$, FADH_2^b) speisen die Atmungskette (siehe Abbildung 2 und Tabelle 2). Bei der oxydativen Phosphorylierung der Reduktionsäquivalente und der vorangegangenen Substratkettenphosphorylierung entsteht schließlich ATP und das ATP/ADP Verhältnis steigt [11,12]. Dieses schließt ATP abhängige K^+ -Kanäle (K_{ATP}) [13]. Sie sind als Heterooktamer aufgebaut aus 4 Poren- ($\text{K}_{\text{ir6.2}}$) und 4 Regulatoruntereinheiten (SUR1^c). SUR1 und $\text{K}_{\text{ir6.2}}$ haben gegenseitig großen Einfluss auf die jeweilige sterische Konfiguration des Anderen [14]. Dies zeigt sich daran, dass sie jeweils Chaperone für einander darstellen und eine Ligandenbindung auch jeweils den Partner beeinflusst [15-17].

^a Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid

^b Flavin-Adenin-Dinucleotid

^c Sulfonylharnstoff(*sulfonylurea*)Rezeptor



ATP-Bilanz

<i>Glykolyse</i>	ATP
-2 ATP	-2
4 NADH/H ⁺	10
4 ATP	4
Zitratzyklus	
2 FADH ₂	3
6 NADH/H ⁺	15
2 GTP	2
	32

Abbildung 2: Schema des Glukosemetabolismus mit Glykolyse, Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion und Zitratzyklus. Es ist jeweils die Produktion von energiereichen Phosphaten und Reduktionsäquivalenten angegeben. aus [18].

Tabelle 2: Bilanz der beim Glukosemetabolismus produzierten ATP. Pro Molekül Glukose werden jeweils 32 Moleküle ATP bzw. GTP synthetisiert. Pro Molekül NADH/H⁺ entstehen etwa 2,5 Moleküle ATP, bei FAD etwa 1,5. [18]

Das Schließen der K_{ATP} führt zu einer Depolarisation der β -Zelle, da keine weiteren K^+ -Ionen ausströmen und damit das Ruhepotential erhalten. Infolge der Depolarisation öffnen spannungsabhängige L- & T-Typ Ca^{2+} -Kanäle (VDCCs^a). Der L-Typ Kanal ist empfindlich für Dihydropyridin^b, hat eine größere Leitfähigkeit und öffnet, sobald das Membranpotential -30mV übersteigt. Der T-Typ VDCC mit geringerer Leitfähigkeit öffnet sich bereits bei einem Membranpotential von -50mV [19].

^a Voltage Dependent Calcium Channel

^b ein Ca^{2+} Antagonist / Ca^{2+} -Kanal-Blocker ein Vertreter ist Nifedipin, zu den Ca^{2+} -Antagonisten zählen auch die s.g. kationisch-amphiphilen mit anderem Wirkmechanismus (z.B. Verapamil, Diltiazem). Sie sind als Antihypertensiva im Einsatz [37].

Um nun die Freisetzung des Insulins aus den Granula in den Extrazellularraum zu erreichen, müssen diese mit der Plasmamembran (PM) verschmelzen (Exozytose). Mittels Kinesin und anderen Proteinen werden die Vesikel in die Nähe der PM transportiert (detailliert zusammengefasst in [20]). Die Exozytose von Insulin erfolgt ähnlich der Neuropeptidfreisetzung an der Synapse.

Das Verschmelzen der Membranen wird über den SNARE^a-Komplex erreicht. Dieser besteht u.a. aus zwei Proteinketten: einem v^b-SNARE in der Vesikelmembran und einem t^c-SNARE in der PM. Deren Interaktion bringt die beiden Membranen einander so nahe, dass sie fusionieren. Vermittelt wird dies durch Synaptotagmin, das als Ca²⁺Sensor dient.

Bei Anstieg der [Ca²⁺]_i verändert es seine Konformation und veranlasst die Membranfusion. Ca²⁺Ionen fungieren als Trigger, da der Vorgang direkt von [Ca²⁺]_i bzw. der lokalen [Ca²⁺] in der Umgebung der Vesikel abhängig ist [11,12,16].

Die Freisetzung des Vesikelinhaltes geschieht über einen Zwischenschritt, der als Hemifusion bezeichnet wird. Dabei vereinigen sich zuerst die äußeren Hälften der Phospholipid-Doppelschichten, wobei die Lumina noch getrennt bleiben, es jedoch schon zu einem Austausch von lipophilen Membranbestandteilen kommen kann [21].

Der Prozess führt nicht zur Integration der Vesikelmembran in die PM, sondern nur zur Bildung einer s.g. Ω Struktur. Das heißt, dass die Fusion unvollständig abläuft und die expandierende Verbindung von Vesikel und Extrazellularraum durch Dynamin-1 wieder zusammengezogen wird (vgl. Abbildung 3). Diese Form der Exozytose und transienten Vesikelfusion ist auch als „*kiss and run*“ oder „*cavi(ty)capture*“ bekannt [20,22].

^a *soluble N-ethyl-maleimide sensitive fusion protein attachment protein receptors*

^b *vesicle*

^c *target*

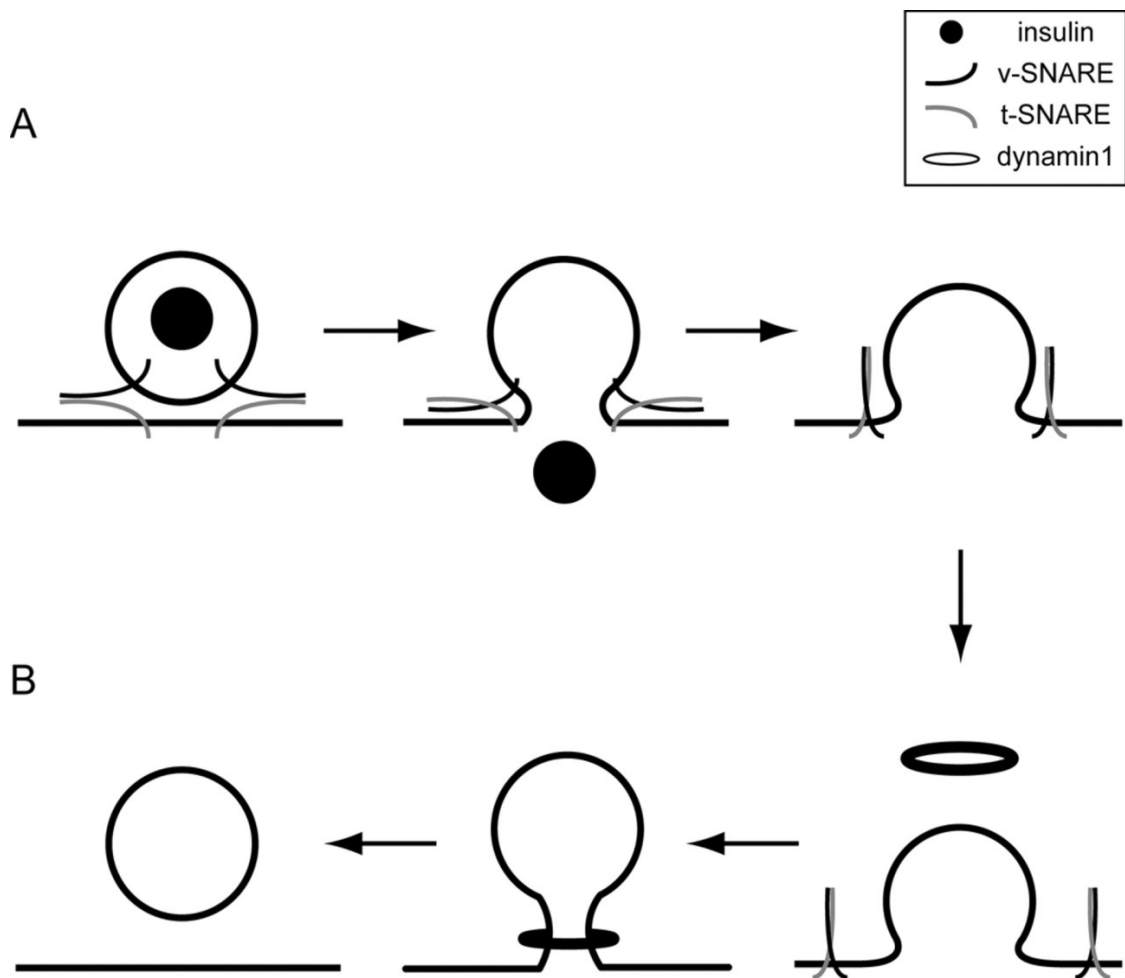


Abbildung 3: „kiss and run“ aus [22]. Das Insulin enthaltende Vesikel fusioniert vermittels SNARE mit der PM und setzt seinen Inhalt frei. Anschließend wird die Verbindung von Dynamin1 umschlossen und wieder abgeschnürt – das Vesikel ist recycelt.

Schließlich geschieht die endokrine Vesikelfusion im Vergleich zur synaptischen langsamer und gleichmäßiger [23]. Dies scheint von der Anordnung von Vesikeln und Ca^{2+} -Kanälen an der PM abhängig zu sein [24].

1.1.2.2.2 Bedeutung der Mitochondrien für die Insulinsekretion

Mitochondrien sind dank des Zitratzyklus und der Atmungskette die Hauptproduzenten für das ATP, welches die K_{ATP} blockiert. Bei Knockdown Experimenten von Untereinheiten des K_{ATP} (SUR1 [25], $\text{K}_{\text{ir}6.2}$ [26]) zeigte sich, dass noch eine GDIS möglich war. Daraus folgt, dass die Insulinsekretion nicht ausschließlich über die K_{ATP} vermittelt wird.

β -Zellen mit einer ausgeprägten GDIS verstoffwechseln die gesamte aufgenommene Glukose über die Atmungskette. Wogegen bei Zellen mit niedrigerer Insulinsekretionsrate das Enzym Laktat-Dehydrogenase exprimiert ist, das bei gesunden Zellen nicht vorkommt. Dadurch nutzt die Zelle nicht die gesamte Kapazität der oxydativen Phosphorylierung aus,

sondern gibt das energiereiche Laktat ab. Deswegen wird weniger ATP produziert und folglich fällt auch die Insulinproduktion niedriger aus [27].

Da ein hohes $\text{NADH}/\text{H}^+ / \text{NAD}$ Verhältnis die Glykolyse hemmt, exprimieren gesunde β -Zellen das Glycerol-3-Phosphat-Shuttle und das Malat/Aspartat Shuttle hoch um NAD über die Atmungskette in den Mitochondrien zu regenerieren [28]. Bei den weniger produktiven Zellen wird NAD über die Reduktion von Pyruvat zu Laktat regeneriert.

Eine wichtige Rolle spielt das Enzym Pyruvatcarboxylase (PC), die Pyruvat in Oxalacetat umwandelt. Dies zählt zu den anaplerotischen Reaktionen im Zitratzyklus, dient zum Auffüllen des Oxalacetatbestandes und stellt damit die initiale Reaktion der Glukoneogenese dar. Dabei fehlen der β -Zelle jedoch die Enzyme Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Fruktose-1,6-Bisphosphatase, welche für die weitere Glukoneogenese notwendig wären. Allerdings hängt die Expression von PC in β -Zellen mit deren Proliferation und GDIS-Rate zusammen [29,30]. Offenbar fördern die Metabolite von Oxalacetat die Insulinsynthese. Dazu zählen Phosphoenolpyruvat, NADPH aus dem Pentosephosphatweg und GTP, das wichtig für die Hemmung der Glutamat-Dehydrogenase ist. Wenn diese Hemmung fehlt, führt dies zu Hyperinsulinismus und damit zu Hypoglykämien [29,31].

Weiterhin spielen Mitochondrien durch Aufnahme und Abgabe von Ca^{2+} eine wichtige Rolle in der Regulation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [32]. Sie nehmen zusätzlich zu ihrer Funktion als ATP-Produzenten Einfluss auf die Insulinfreisetzung.

Dabei steigt die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ bei Stimulation mit Glukose entsprechend der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ an, wobei die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ mindestens zweifach höher waren als die $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Allerdings gab es Unterschiede in der Kinetik der Änderung (Δ) von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je nachdem ob $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Depolarisation und Ca^{2+} Einstrom durch VDCC oder über Freisetzung aus intrazellulären Speichern mittels IP_3 hervorgerufen wurde. Daher wird eine Lokalisation der Mitochondrien von INS-1 Zellen in Beziehung zu den VDCC erwogen, was deren Abhängigkeit vom extrazellulären Ca^{2+} Einstrom und ihre im Vergleich zum Zytosol stärkere Ca^{2+} Aufnahme erklärt [33-35].

1.1.2.2.3 Modulation der Insulinsekretion über G-Protein gekoppelte Rezeptoren:

Wesentliche Modulation erfährt die GDIS über G-Protein gekoppelte Rezeptoren. In der β -Zelle werden durch sie zwei membrangebundene Enzymkaskaden gesteuert (siehe folgende Abbildungen).

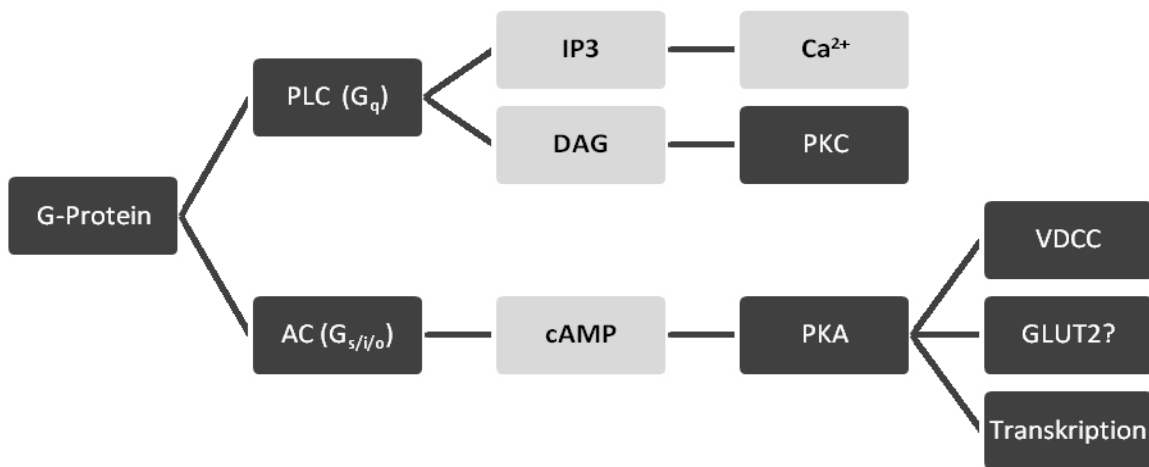


Abbildung 4: G-Proteinsignalwege in der β -Zelle (dunkel: Enzyme, hell: second messenger) nach [16]

Rezeptor	G-Protein	aktiviertes Enzym
Sekretin, GLP-1, GIP	G _s	AC
β_2 adrenerg	G _s	AC
α_2 adrenerg	G _i	AC
Muskarinerg/Cholinerg	G _q	PLC

Tabelle 3: G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit ihren Liganden und Signalwegen (Auszug) [16]

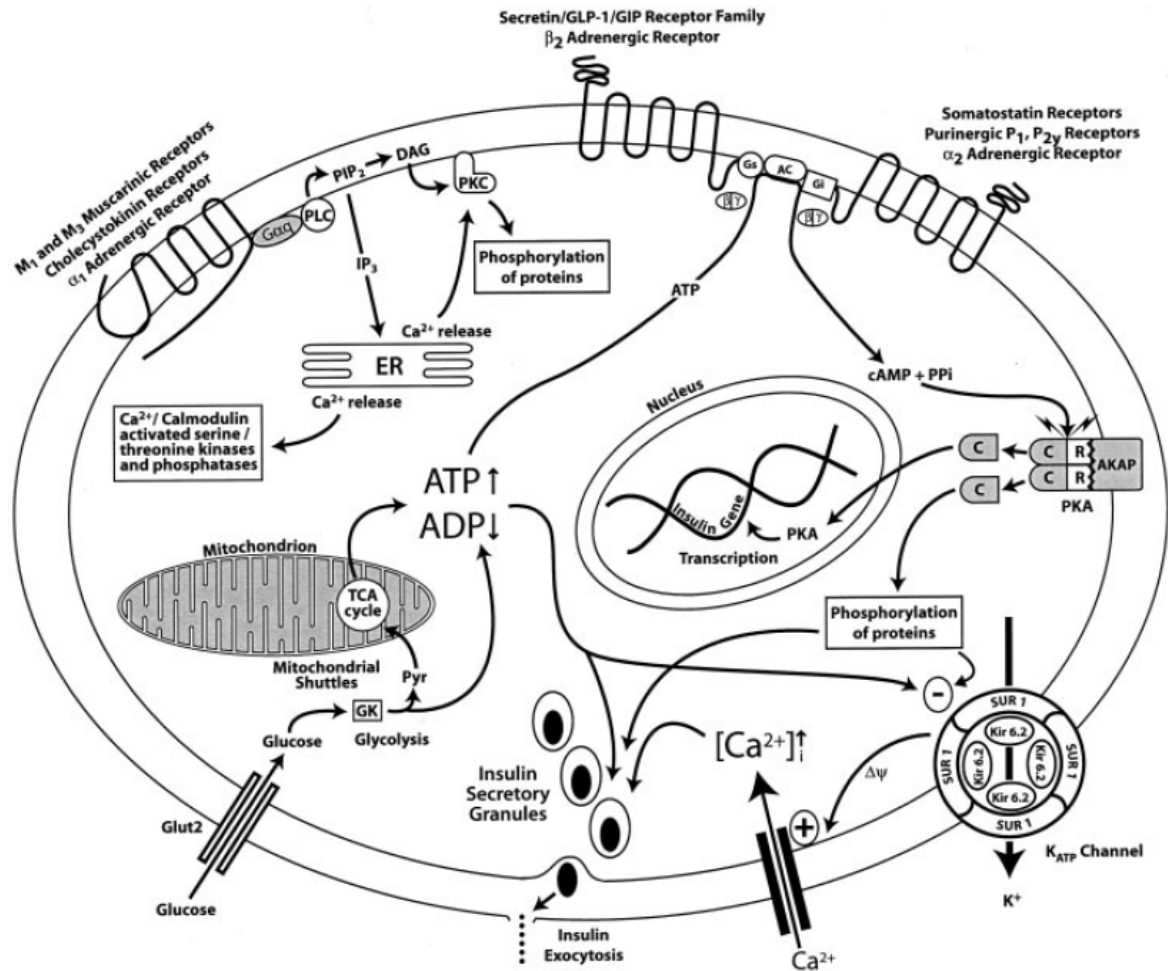


Abbildung 5: Glukoseinduzierte Insulinsekretion geschieht infolge steigender [Glukose] über ein höheres ATP/ADP-Verhältnis, K_{ATP} -Kanalklokkade, Depolarisation und Ca^{2+} -Einstrom durch VDCC, außerdem über 7-Helixrezeptoren, G_{α} -Proteine, die PLC-Kaskade und damit verbundene Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern (ER). Über andere Liganden und G_{β} - bzw. G_{γ} -Proteine und damit die Steigerung bzw. Senkung der [cAMP] erfolgt eine Modulation. Aus [16]

1.1.2.2.4 Weitere Faktoren, welche die Insulinsekretion beeinflussen

Neben der [Glukose] stimulieren weitere Faktoren die Insulinfreisetzung:

Plasmakonzentrationen von AS (speziell Leucin, Arginin, Alanin) und Acetacetat, geringfügig auch Fettsäuren.

Gastrointestinale Hormone wie GLP (*glucagon like peptide*), GIP (*gastric inhibitory peptide*)^a, Glukagon^b, Sekretin, Gastrin, ACTH (Kortikotropin), GH (Somatotropin) via cAMP sowie Cholezystokinin via IP_3 /DAG.

^a Ihre Ausschüttung erfolgt nach oraler Nahrungsaufnahme im oberen (GIP aus K-Zellen) und unteren (GLP aus L-Zellen) Dünndarm und führt zum s.g. Inkretineffekt.

^b aus α -Zellen, erreicht die β -Zellen aufgrund der Vaskulatur jedoch nur über den systemischen Kreislauf und hat daher geringe Wirkung

Weiterhin spielt die $[K^+]$ mittels der Depolarisierung über den K_{ATP} eine Rolle: Hyperkaliämie wirkt dem Ausstrom entgegen, beschleunigt so die Depolarisation und fördert die Insulinsekretion. Hypokaliämie hemmt sie entsprechend. [36]

Schließlich lässt sie sich medikamentös steigern. Prominente Vertreter sind die Sulfonylharnstoffe, die wie ADP vom Zytoplasma aus an den SUR1 binden, dadurch jedoch zum Schließen der K_{ATP} führen. Neuentwicklungen stellen die GLP-1-Analoga bzw. DPP-4^a Hemmer dar [11,37].

1.1.2.2.5 Charakteristik der Insulinausschüttung

Es lassen sich mehrere Phasen der Insulinausschüttung unterscheiden:

- Basale, postabsorptive Ausschüttung
- Cephal Phase, neural mediert und ausgelöst durch den Anblick, Geruch und Geschmack der Speise [38]
- Erste Phase der Insulinausschüttung, eine initiale, starke und kurze Antwort auf einen plötzlichen, starken Anstieg der $[Glukose]_{Blut}$ (etwa in Folge einer intravenösen Applikation) binnen 5-10 Minuten
- Zweiter, kontinuierlicher Anstieg der $[Insulin]_{Blut}$ proportional zur Dauer der Glukosestimulation [39]

Die erste und zweite Phase machen die populäre Darstellung der Insulinantwort als initialem Peak mit anschließendem Abfall der Kurve und erneutem, langsamem Anstieg aus. Diese Antwort erhält man jedoch nur auf Stimulierung mit intravenöser Glukoseinfusion oder in vitro, wobei man die β -Zellen sehr hohen $[Glukose]$ aussetzt (siehe Abbildung 6 A). Die physiologische Insulinantwort durch Nahrungsaufnahme zeigt nur einen kontinuierlichen Anstieg der $[Insulin]_{Blut}$ (siehe Abbildung 6 B). Hier wirken nicht nur die (niedrigere) $[Glukose]$, sondern auch weitere sekretagoge Substanzen wie AS oder gastrointestinale Hormone [40].

^a Dipeptidyl-Peptidase 4 baut GLP-1 ab

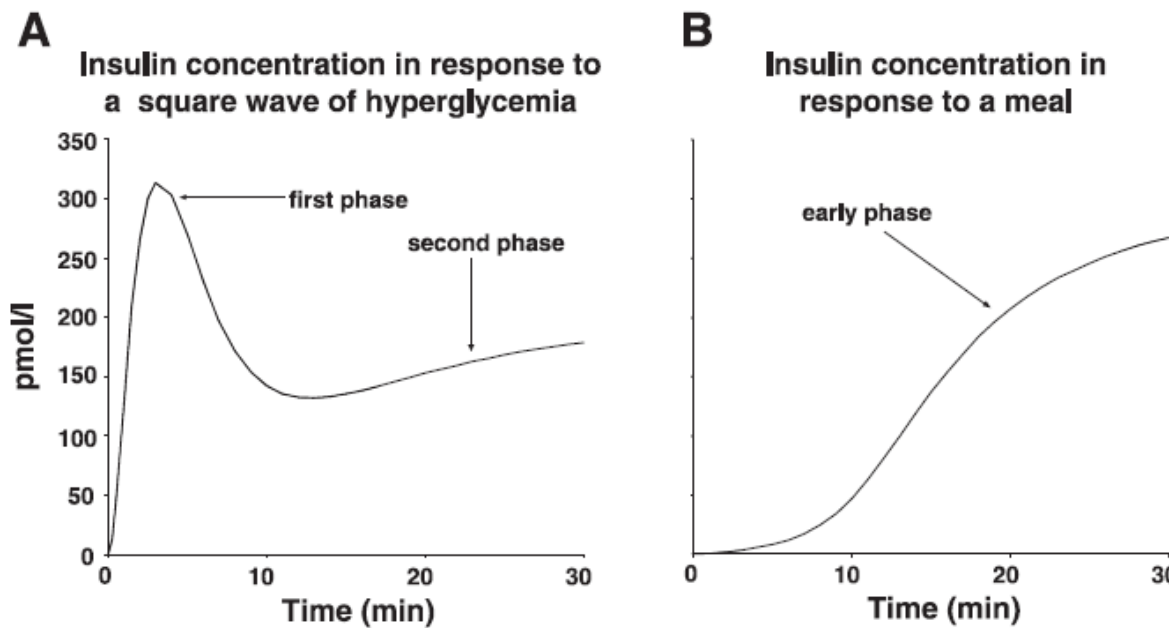


Abbildung 6: A: Insulinantwort auf abrupten, hohen Glukosereiz, B: physiologischer Anstieg der $[\text{Insulin}]_{\text{Blut}}$ infolge einer Mahlzeit aus [40]

Außerdem oszilliert die Insulinfreisetzung aller Langerhans-Inseln synchron in einem Intervall von 5-15 Minuten [41], wobei die Steuerung dieses Phänomens noch nicht hinreichend erklärt ist. Es wird eine autonome Innervation des Pankreas erwogen, da die Zellen innerhalb einer Insel einer elektrophysiologischen Koppelung unterliegen [42]. Weiterhin kommt eine hormonelle oder metabolische Steuerung in Frage [43].

Eine ausführliche Sammlung an Übersichtsartikeln zum Thema Insulinsekretion findet sich in einer Sonderausgabe der Zeitschrift Diabetes (Diabetes 51, Suppl 1, 2002).

1.1.3 Molekulare Wirkmechanismen von Insulin

Einen großen Teil seiner Wirkung entfaltet das Insulin aufgrund seiner Ausschüttung in den Pfortaderkreislauf in der Leber, wo bereits etwa die Hälfte abgebaut wird. In geringerer Konzentration erreicht Insulin dann die weiteren insulinsensitiven Gewebe. Dort bindet der Ligand an seinen Tyrosinkinaserzeptor, der grundsätzlich dimerisiert vorliegt. Die Wirkung von Insulin führt zur Autophosphorylierung von 7 Tyrosinresten. Mit ihnen reagieren die sekundären Botenstoffe (*second messenger*), nämlich die Insulin Rezeptor Substrate (IRS) mittels ihrer Phosphotyrosin bindenden Domäne und werden ihrerseits an Tyrosinresten phosphoryliert. Diese dienen wiederum der Bindung von SH2 Domänen weiterer Proteine aus mehreren Signalkaskaden (z.B. PI3K, ras, MAP Kinase

Kaskade etc.). Die Folge sind vielfältige Auswirkungen auf etwa Vesikeltransport (GLUT4 Einbau in die PM in Fettgewebe und Muskulatur), Proteinsynthese, Enzymaktivität (Glykogen- & Fettsynthese), Genexpression und schließlich Zellteilung [44,45].

Zentral scheint Insulin eine ähnliche Wirkung wie Leptin zu entfalten. Dieses bewirkt bei hypothalamischen Neuronen durch die Öffnung von ATP abhängigen K^+ -Kanälen (K_{ATP}) eine Hyperpolarisation. Sowohl der Leptin- als auch der Insulinsignalweg (über IRS) funktionieren vermittelt PI3K [46,47]. Dadurch hat Insulin auch Einfluss auf unser Hungergefühl und Essverhalten. Ein umfassendes Konzept zur zentralen Steuerung von Hungergefühl, Nahrungsaufnahme und Energiestoffwechsel haben Peters et al erstellt (siehe [48]).

Die molekularen Hintergründe für die Insulinresistenz - einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 - scheinen zum Teil, in der Modulation des Insulin-Signalweges durch Phosphorylierung der IRS-Proteine zu liegen [49].

Insulinrezeptoren finden sich in fast allen Organen (Ausnahmen: Erythrozyten Intestinale Mukosa, Niere) und haben daher vielfältige Auswirkungen auf den Metabolismus. Die Effekte auf Leber, Skelettmuskulatur (Mm.) und Fettgewebe sind aufgrund ihrer Stoffwechselaktivität und Masse besonders relevant und in folgender Tabelle zusammengefasst [12]:

	Molekulare Effekte	Metabolische Effekte
Schnelle Reaktion	GLUT-4 Einbau in die PM	↓ [Glukose] _{Blut} ↑ Glykolyse (Mm.) ↑ Triacylglycerol (TAG) synthese (Fettgewebe)
	Aktivierung der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase	↓ [cAMP] ↓ Lipolyse (Fettgewebe) ↓ Glykogenolyse & ↑ Glykogensynthese (Leber & Mm.) ↓ Glukoneogenese (Leber)
	↑ AS-Transport in die Mm.	↑ [AS] _i ↑ Proteinbiosynthese
	Induktion Lipoproteinlipase (LPL)	↑ Spaltung von VLDL ^a -TAG ↑ TAG-Biosynthese
Verzögerte Reaktion	Induktion von Glukokinase, Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase	↑ Glykolyse
	Repression von PC, PEP ^b -Carboxykinase, Fruktose-1,6-Bisphosphatase und Glukose-6-Phosphatase	↓ Glukoneogenese (vgl. Mitochondrienregulation)

Tabelle 4: Zelluläre Effekte der Insulinrezeptoraktivierung und deren metabolische Auswirkungen nach [12].

^a *very low density lipoprotein*^b Phosphoenolpyruvat

1.2 $[Ca^{2+}]_i$ Regulation

Ca^{2+} -Ionen nehmen als *second messenger* auf viele intrazelluläre Vorgänge Einfluss. In Ruhe ist die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) (mit 30 bis 150 nM) etwa 10.000 mal geringer als die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_e$). Durch diesen hohen Konzentrationsgradienten sind ein sehr schneller Einstrom und damit auch schnelle Effekte möglich. Kurzzeitig kann dabei die $[Ca^{2+}]_i$ auf $5\mu M$, lokal sogar bis $100\mu M$ ansteigen [50].

Bei der Ca^{2+} Homöostase unterscheidet man On- & Off-Reaktionen. Erstere bewirken einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ etwa durch Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum wie bei der Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle oder Freisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem ER über Ryanodin-Rezeptoren (*calcium induced calcium*

release CICR z.B. bei Muskelkontraktion) oder den IP_3 Signalweg (etwa infolge der Aktivierung von G_q -Protein gekoppelten 7-Helix-Rezeptoren vergleiche Abbildung). Off-Reaktionen senken die $[Ca^{2+}]_i$ indem sie die Ionen aus der Zelle befördern. Hierfür stehen einerseits Ca^{2+} Pumpen, die sogenannte *plasmamembrane Ca^{2+} ATPase* (PMCA), und andererseits Ca^{2+} Austausch, wie etwa der Na^+/Ca^{2+} -Austauscher zur Verfügung (NCX^a). Eine rasche Reduktion der $[Ca^{2+}]_i$ wird auch durch das Pumpen von Ca^{2+} zurück in das ER erreicht. Die sogenannte Sarco-Endoplasmatische- Ca^{2+} -ATPase (SERCA^b) befördert unter

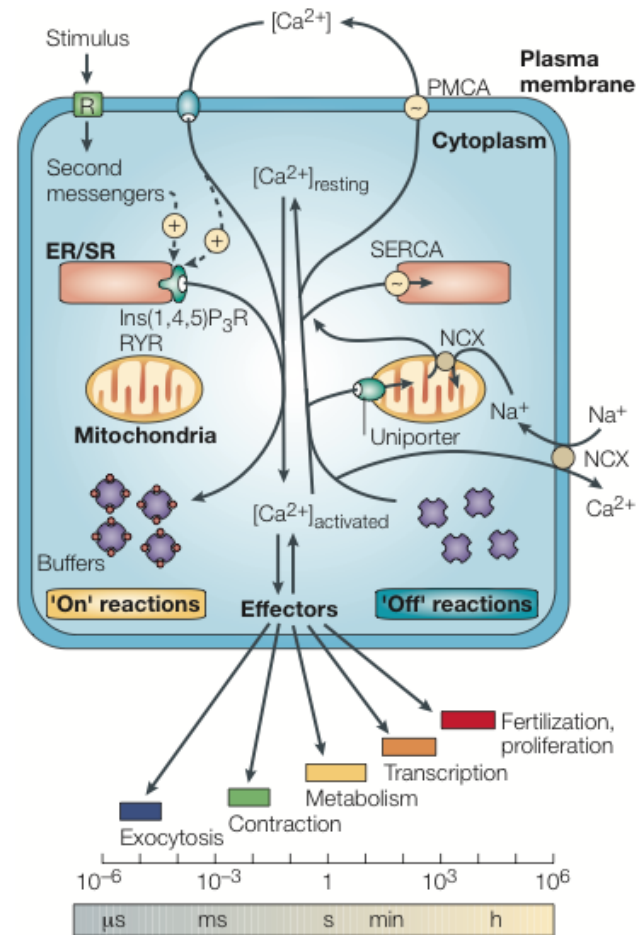


Abbildung 7: Prozesse der Ca^{2+} -Regulation aus [51]. links: Ca^{2+} -Einstrom und CICR erhöhen $[Ca^{2+}]_i$. rechts: die $[Ca^{2+}]_i$ wird dadurch gesenkt, dass Pumpen wie SERCA und PMCA das Ca^{2+} aktiv, unter ATP-Verbrauch in das ER oder den Extrazellularraum befördern. Außerdem transportieren NCX in Plasma- und Mitochondrienmembran das Ca^{2+} aus der Zelle bzw. in die Mitochondrien. Unten: Ca^{2+} abhängige Effekte. Je nach Dauer der Ca^{2+} Einwirkung werden bestimmte Prozesse initiiert.

^a Na^+/Ca^{2+} exchanger

^b sarko(endo)plasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase

ATP-Spaltung Ca^{2+} in das Lumen des ER. Schließlich puffern/sequestrieren Mitochondrien Ca^{2+} und setzen es dann allmählich frei [51].

Zu den On-Reaktionen lässt sich auch der *Store Operated Calcium Entry* (SOCE) zählen. Dieses Phänomen beschreibt die Regulation eines Ca^{2+} Einstromes aus dem Extrazellularraum infolge der Entleerung des ER, was als „*store depletion*“ bezeichnet wird. SOCE dient also dem wieder Auffüllen leerer intrazellulärer Ca^{2+} Speicher.

Dabei stellt STIM1 einen Sensor für die Konzentration an freiem Ca^{2+} im ER ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) dar. Es handelt sich um ein Transmembranprotein in der ER-Membran. Seine Funktion erfüllt STIM1 mittels N-terminalen, Ca^{2+} -bindenden EF-hand-Motiven, die in das ER ragen. Nach Abdissotiation der Ca^{2+} -Ionen oligomerisieren die Transmembranproteine mittels ihrer SAM^a-Domäne und aggregieren in „*puncta*“ genannten Arealen geringen Abstands von ER- und Zellmembran [52,53]. Wie dies geschieht ist noch unklar. Arbeiten zeigen, dass inaktives STIM1 ($+\text{Ca}^{2+}$) mit dem *plus end tracking protein* EB1 interagiert und von diesem entlang der Mikrotubuli in die Zellperipherie und folglich in die Nähe der Zellmembran transloziert wird [54]. Bei *store depletion* wird diese Verbindung gelöst und STIM1 interagiert mit Orai1 in der PM [55].

Bei den Recherchen zu dem Thema stieß ich auf die Hypothese, dass man anhand des SOCE ein neues „Sub“organell entdeckt habe. Demnach ist die Translokation von STIM nicht mit der des ER assoziiert und zeigt einen Übergang von fibrillären Strukturen in die o.g. puncta. Dies führt zu der Theorie, dass es ein Kompartiment innerhalb des ER gibt, welches speziell für die Ca^{2+} -Speicherung und SOCs verantwortlich ist [56].

Orai1 (auch CRACM1b) liegt verteilt – wahrscheinlich als Dimer – in der PM vor. Dabei handelt es sich um Proteine mit vier Transmembrandomänen und zytoplasmatischem N- und C-Terminus. Durch STIM1 aktiviert, bildet es Tetramere, die als Ionenkanal aktiv sind und den SOCE bewirken [55,57,58].

Außerdem kann STIM1 auch Mitglieder der *transient receptor potential* Ionenkanäle der canonical Gruppe (TRPC) rekrutieren, eine Gruppe von unspezifischen Ionenkanälen, welche bis zur Entdeckung von STIM und Orai für den SOCE verantwortlich gemacht wurde [59]. Diese Untereinheiten bilden Heteromere mit Orai, wodurch der SOCE moduliert wird. Die Organisation dieser Komplexe erfolgt vermutlich in „*lipid rafts*“ [52]

^a Sterile α -Motif

(Zum Mechanismus des SOCE vergleiche Abbildung 8). Die Lokalisation von STIM1 und Orai1 ist in den Aufnahmen von Kapitel 3.2.1 abgebildet.

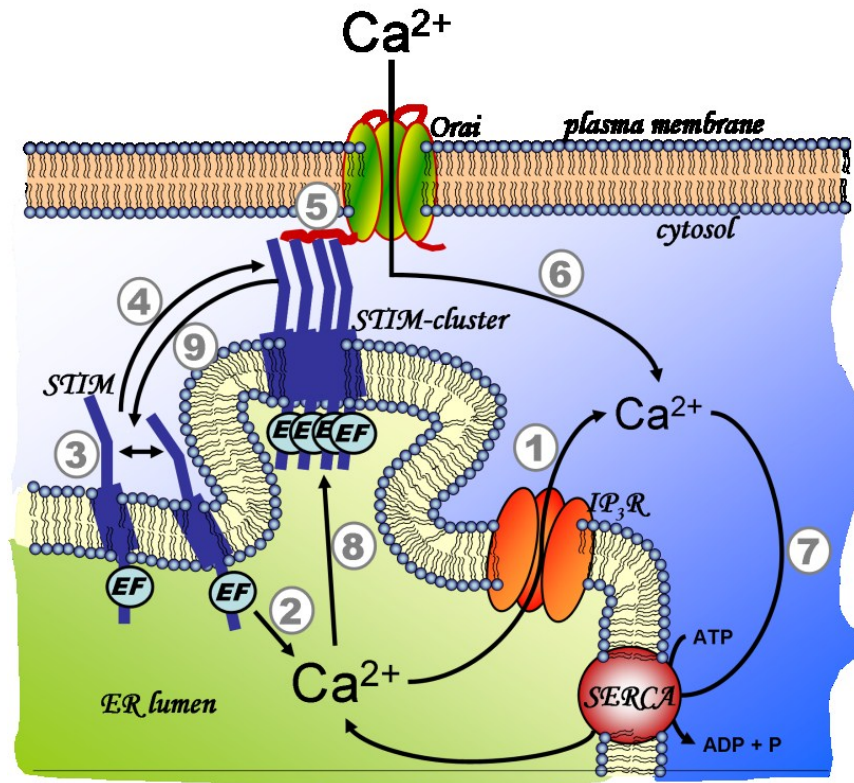


Abbildung 8: Prinzip des SOCE: 1) store depletion hier über den IP₃Rezeptor führt zur Abgabe von Ca²⁺ aus dem ER in das Zytoplasma. Von dort wird ein Teil des Ca²⁺ von SERCA zurück in das ER transportiert, etwas geht jedoch über PMCA und NCX in den Extrazellulärraum verloren. 2) Folglich sinkt die [Ca²⁺]_{ER} und Ca²⁺ bindet weniger häufig an die EF-hand Motive von STIM, welches als Ca²⁺-Sensor dient. 3) Die fehlende Ca²⁺-Bindung führt zu einer Konformationsänderung und 4) Oligomerisierung der STIM Moleküle in s.g. puncta. 5) An diesen Stellen nahe der PM rekrutieren die STIM-Komplexe Orai-Moleküle, die dann als Tetramere einen Ca²⁺-Kanal bilden, was zum 6) Ca²⁺-Einstrom in das Zytoplasma führt. 7) Das Ca²⁺ aus dem Zytoplasma wird schließlich von SERCA in das ER gepumpt und die [Ca²⁺]_{ER} normalisiert.

1.3 Arbeitshypothese

Diese Arbeit fußt auf folgender grundlegenden Arbeitshypothese:

Der SOCE durch STIM1 und Orai1 beeinflusst die Glukose induzierte Insulinsekretion (GDIS) in β -Zellen.

1.4 Wissenschaftlicher Hintergrund – putative molekulare Mechanismen

Northern blots zahlreicher Gewebe legen eine ubiquitäre Expression sowohl von STIM1 [60] als auch Orai [58] nahe [61]. Außerdem konnte SOCE in Insulin ausschüttenden β -Zellen beobachtet werden, wobei diese Prozesse von STIM1 abhängig waren [62]. Die Autoren dieser Arbeit konnten sowohl STIM1 mRNA als auch STIM1 Protein in der β -Zelllinie MIN6^a und in frisch isolierten Langerhans-Inseln aus der Maus nachweisen.

Inwieweit der STIM1/Orai1 abhängige SOCE die Insulinausschüttung aus β -Zellen beeinflusst wurde noch nicht untersucht.

Es ist denkbar, dass SOCE den Glukose induzierten Ca^{2+} Einstrom über spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle (VDCC) unterstützt und auf diese Weise, durch eine Erhöhung der subplasmalemalen Ca^{2+} Konzentrationen, die Insulinausschüttung verstärkt. Die Aktivierung von SOCE setzt eine zumindest partielle Ca^{2+} Entleerung des ER voraus. Inwieweit dieser Prozess durch Glukose ausgelöst wird ist nicht bekannt.

Möglicherweise führt der über Glukose ausgelöste Ca^{2+} Einstrom über L-, -und T-Typ Ca^{2+} Kanäle zu einer Ca^{2+} induzierten Ca^{2+} Freisetzung (CICR), wodurch das ER Ca^{2+} verliert und der STIM1/Orai1 abhängige SOCE aktiviert wird [63] (vgl. Abbildung 9).

Alternativ könnte die Translokation von STIM1-Proteinen bei ER Ca^{2+} Entleerung auch zu einer direkten Beeinflussung der Aktivität von spannungsabhängigen Ca^{2+} Kanälen in β -Zellen führen, was einen Einfluss auf die Insulinsekretion zur Folge hätte. Unlängst wurden tatsächlich Wechselwirkungen zwischen STIM1 und VDCC in erregbaren Zellen gezeigt [64].

^a Mouse Insulinoma 6. Subklon

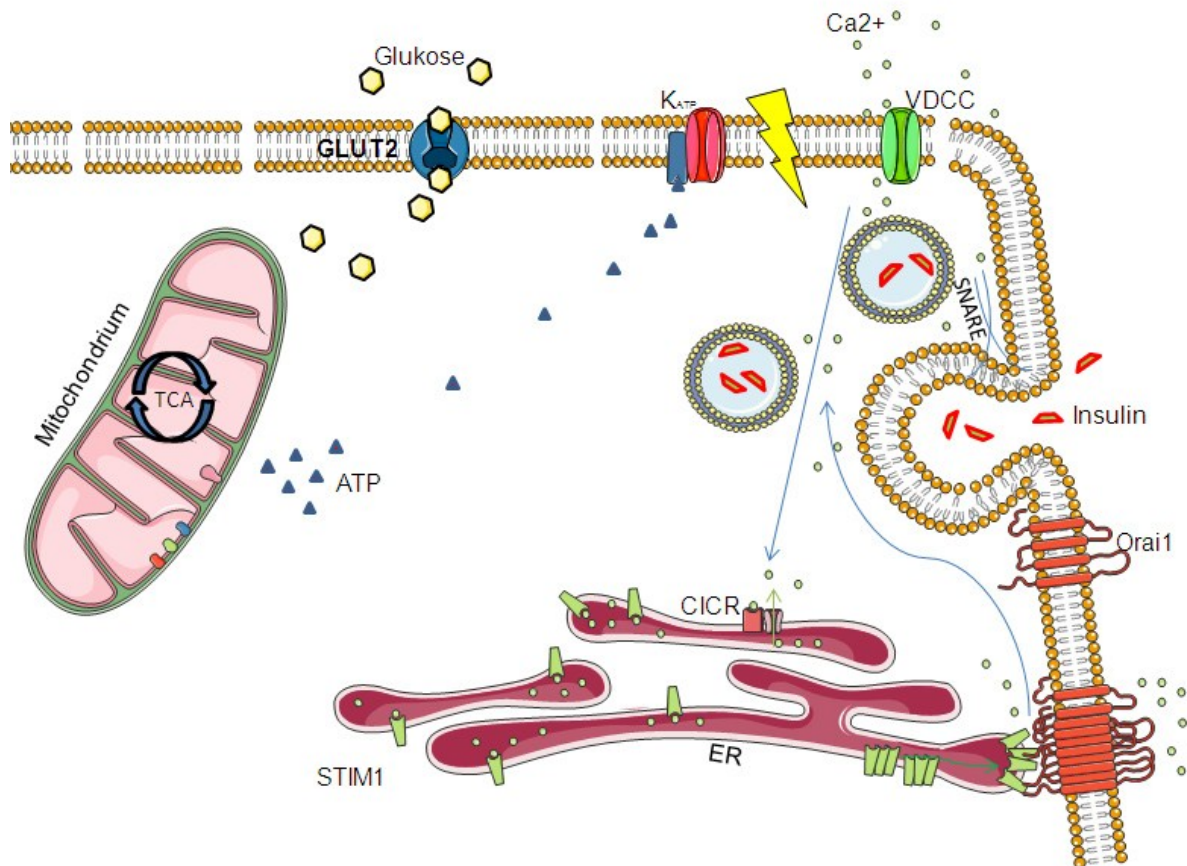


Abbildung 9: Hypothetische Beeinflussung der GDIS durch SOCE. Glukose wird aus dem Blut aufgenommen und über Glykolyse, Pyruvatdehydrogenase, Zitratzyklus (TCA) und Atmungskette metabolisiert, wobei ATP entsteht (1.1.2.2.1). Dieses schließt K_{ATP} und depolarisiert damit die PM worauf VDCC öffnen und Ca²⁺ einströmt. Dies bewirkt einerseits direkt eine Insulinausschüttung (siehe Abbildung 3). Andererseits – so die Annahme – kann ein CICR ausgelöst werden, der die Insulinausschüttung verstärkt und zu *store depletion* führt. Die geringere [Ca²⁺]_{ER} bewirkt die Bildung von STIM-Clustern und Aktivierung von Orai-Kanälen. Durch sie kommt es zum Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ (SOCE), welches wiederum zur Exozytose von Insulin führt (vgl. Abbildung 8). Die Expressionslevels von STIM1 und Orai1 könnten somit einen Einfluss auf die Stärke des SOCE und damit auf die ausgeschüttete Insulinmenge haben. (Figure was produced using Servier Medical Art)

1.5 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, durch eine gezielte Manipulation der Expressionslevel von STIM1 und Orai1 in β -Zellen, die mögliche Bedeutung dieser beiden Proteine für die Insulinsekretion zu ermitteln (vgl. Abbildung 9).

Zur Beantwortung der Arbeitshypothese wurde ein Zellmodell aus Ratten gewählt (INS-1). Diese β -Zelllinie und insbesondere ihre GDIS sollten zunächst genauer charakterisiert werden. Hierzu sollte u.a. ein ELISA-Kit verwendet werden, welcher für Seruminsulin ausgelegt ist und dementsprechend an die Experimente zu adaptieren war. Es galt außerdem, Bedingungen zu finden, unter welchen eine reproduzierbare Glukose stimulierte Insulinausschüttung gemessen werden konnte.

Anschließend sollten STIM1 und Orai1 überexprimiert werden und der Einfluss der Konzentrationserhöhung dieser beiden Eiweißmoleküle auf die Insulinausschüttung ermittelt werden.

In analoger Weise sollte der Effekt von siRNA vermittelten Verringerungen der Expressionslevel von STIM1 und Orai1 auf die Glukose induzierte Insulinausschüttung in INS-1 Zellen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben stammen alle verwendeten Chemikalien von Roth (Karlsruhe, Deutschland).

2.2 Zellkultur

Als Zellmodell wurde eine strahleninduzierte Insulinomzelllinie aus Ratten verwendet. Die INS-1 Zellen zeigen viele der physiologischen Charakteristika von β -Zellen – sie exprimieren etwa GLUT-2 und Glukokinase, proliferieren und zeigen eine annähernd physiologische GDIS. Jedoch ist ihr Insulingehalt auf etwa 20% reduziert [65,66].

INS-1 Zellen wurden von Univ.-Prof. Dr. Markus Ritter (PMU Salzburg) zur Verfügung gestellt und hatten eine hohe Passagezahl (≥ 123) erreicht. Sie wurden in 10cm Kulturschalen mit einem modifizierten RPMI-1640 Medium (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre kultiviert und nach fünf Tagen mittels Trypsin-EDTA (0,5g/l Trypsin, 0,02% EDTA (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA) in PBS) passagiert [67].

INS-Kulturmedium:

RPMI-1640 +10% fetal calf serum, 2mM L-Glutamin, 1mM Na-Pyruvat, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol, 100U/l Penicillin, 0,1g/l Streptomycin

Der Zusatz von Mercaptoethanol ist zur erfolgreichen Kultivierung erforderlich. Ohne diese Substanz zeigen die Zellen ein geringeres Wachstum und produzieren etwa 80%

weniger Insulin [65]. Sie büßen in Kultur nach 2-3 Monaten mindestens die Hälfte ihrer Glukoseantwort ein [67], was bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen ist. Zur Messung wurden die Zellen in sechs- bzw. zwölf-well Platten (costar[®] 3516 bzw. 3513, Corning Inc., Corning, NY, USA) mit einer Dichte von etwa $5 \cdot 10^5$ Zellen/Well (12-Well) ausgesetzt und nach etwa drei Tagen verwendet. Für die fluoreszenzmikroskopischen Experimente wurden die INS-1 Zellen auf 30mm Glasplättchen in 6-Well-Platten kultiviert.

2.3 Transfektion

Zum Einbringen von DNA bzw. siRNA in die INS-1 Zellen wurde ein Transfektionsreagenz auf Lipidbasis verwendet.

Das TransFast[™] Reagenz besteht aus dem kationischen amphiphilen Lipid (+)-N,N [bis (2-hydroxyethyl)]-N-methyl-N- [2,3-di(tetradecanoyloxy)propyl] Ammonium Iodid und dem neutralen Phospholipid DOPE^a [68]. Diese Substanzen bilden mit den Nukleinsäuren in wässriger Lösung Mizellen^b, welche in der Lage sind, biologische Membranen zu überwinden und ihren Inhalt so im Zellinneren freizusetzen. Dabei ist es notwendig, dass die Mizellen mit der Membran verschmelzen, um einen lysosomalen Abbau zu vermeiden. [69].

Die transiente Transfektion mit STIM-YFP (n-terminal), Orai-CFP bzw. der STIM siRNA erfolgte bei etwa 70% Konfluenz mittels des TransFast[™] Transfektionsreagenz (Promega, Mannheim, Deutschland). Dabei wurde die DNA/RNA in DMEM Kulturmedium gelöst und anschließend das TransFast Reagenz zugesetzt. (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – low glucose*, D5523, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA) Das DMEM wurde mit 850mg/l NaHCO₃ und 6g/l HEPES supplementiert. Mit dieser Mischung wurden die Zellen über eine Stunde inkubiert, danach wurde sie mit normalem INS-Medium 1/1 verdünnt. Die Messungen erfolgten etwa 18 Stunden später.

Die Konstrukte wurden dankenswerterweise von a.o. Univ.-Prof. Dr. Christoph Romanin (Johannes Kepler Universität Linz) zur Verfügung gestellt. STIM1 wurde n-terminal an pEYFP gehängt, Orai1 c-terminal an pECFP-N1 zwischen den Restriktionsenzymchnittstellen XhoI und BamHI eingefügt [70].

^a DioleOylPhosphatidylEthanolamin

^b Assoziationskolloide

Als Kontrollen dienten die Transfektion mit einem Konstrukt, welches nur pEYFPF enthielt für die Überexpression bzw. mit *Allstars Negative Control siRNA* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)

Protokoll Transfast für INS

in 12-Well-Platten

Benötigt wird:

- 80% Konfluenz
- 1µg DNA pro Well
- DMEM-Kulturmedium (3ml/12-Well)
- 2µl Transfast Reagenz pro Well

Ablauf:

1. Aufgetaute DNA-Stocks vortexen
2. 1µg DNA in 250µl DMEM Kulturmedium (ohne Serum und Antibiotika) pro Well verdünnen
3. 2µl Transfast Reagenz pro Well hinzufügen und kurz vortexen
4. Mischung für 10-15min bei Raumtemperatur inkubieren
5. Kulturmedium der Zellen absaugen
6. 250µl der Mischung pro Well hinzufügen
7. bei 37°C und 5% CO₂ für 1h inkubieren
8. nach 1h 250µl normales Kulturmedium (INS) hinzufügen
9. Mediumwechsel nach 15h bei siRNA / 6h bei DNA

Allstars si: 1,250 µl/Well

Rat STIM si: 0,625 µl/Well

in 6-Well-Platten

500µl/Well Transfast Medium

2µg DNA/Well

+500µl/Well INS-Medium nach 1h

Tabelle 5: Protokoll Transfast für INS

2.4 RNA Interference (RNAi, RNA silencing)

Bei diesem Prozess führen kurze RNA-Abschnitte von 20-30 Nukleotiden Länge s.g. si^aRNAs zur Repression von homologen Genen. (Der Begriff RNAi umfasst außerdem die Wege über rasiRNA und miRNA. Siehe dazu [71].) Auslöser ist ds^bRNA. Sie wird von diversen Enzymen, die man als „*RNAi machinery*“ zusammenfasst prozessiert. Anfangs wird die dsRNA endonukleolytisch von der Ribonuclease III (RNase III) alias Dicer gespalten und an RISC^c übergeben. Welcher der beiden RNA-Stränge geladen wird und folglich als „*antisense strand*“ fungiert, hängt von der Basensequenz und Struktur der dsRNA-Fragmente ab – offenbar wird der am 5'Ende weniger fest gebundene Strang bevorzugt. Von diesen Regeln hängt es auch ab, ob das Design einer neuen siRNA erfolgreich ist oder nicht. Wird der „*guide strand*“^d im RISC Komplex implementiert, sorgt er mithilfe der Argonauten Proteine für die Spaltung neuer mRNA, die vom Gen weiterhin abgelesen wird. Das Gen ist nun „stumm“ (*silencing*) [71].

Zum Knockdown von STIM1 wurde siRNA (Microsynth, Balgach, Schweiz) verwendet.

Basenfolge: 5'GCU GCG UGA CGA GAU CAA U dTdT 3'.

2.5 Mikroskopie

2.5.1 Konfokale Mikroskopie

Zur Beobachtung der detaillierten topographischen Verteilung von Mitochondrien und STIM-Proteinen wurden Schnitte mittels eines konfokalen laser-scan Mikroskops angefertigt. Dieses basiert auf der Anordnung einer Nipkow-Scheibe vor einem 150mW Argon Laser (Laser Physics; West Jordan, UT, USA) und realisiert eine Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe in zweidimensionalen Schnittebenen. Das System ist an ein Zeiss Axiovert 200M Mikroskop (Zeiss Microsystems, Jena, Germany) montiert und wird kraft der Metamorph 6.2r6 Software (Universal Imaging, Visitron Systems, Puchheim, Germany) gesteuert.

^a *Small Interfering*

^b doppelsträngige

^c *RNA-Induced Silencing Complex*

^d der „*passenger strand*“ wird abgebaut

2.5.2 Färbung von Mitochondrien mit Mitotracker green

Zur Darstellung der Mitochondrientopographie wurde der Fluoreszenz-Farbstoff MitoTracker Green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) verwendet. Dieser diffundiert aufgrund seiner positiven Ladung in die Mitochondrien, wird dort oxidiert, damit fluoreszierend und bindet anschließend kraft eines Chlormethylrestes kovalent an Thiolgruppen von Proteinen, sodass er im Mitochondrium verbleibt [72]. Die INS-1 Zellen wurden für 5 Minuten mit 1 nM MitoTracker Green bei Raumtemperatur beladen.

2.5.3 FRET-Mikroskopie

Bei der *Förster Resonance Energy Transfer* Mikroskopie (FRET) wird die Nähe zweier Fluorophore zueinander messbar. Voraussetzung für FRET ist, dass sich das Emissionsspektrum des einen Fluorophors (Donator) mit dem Exzitationsspektrum des anderen Fluorophors (Akzeptor) überlappt. Diese Technik wird einerseits zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen [70] verwendet. Andererseits gibt es zahlreiche Sensoren für kleinere Biomoleküle, Ionen und Signalwege, welche nach dem FRET-Prinzip funktionieren [73]. Solche Sensoren bestehen aus zwei Fluorophoren (meist sind es die fluoreszierenden Proteine CFP als Donor und YFP als Akzeptor), die über besondere Peptide miteinander verknüpft sind. Diese Peptide dienen als Bindungsstelle für jene Biomoleküle oder Ionen, welche in biologischen Materialien quantifiziert werden sollen. Durch die Bindung der zu messenden Biomoleküle oder Ionen tritt eine Konformationsänderung des Peptides ein, was die Fluorophore zusammendrängt und in enge räumliche Beziehung treten lässt. Im ungebundenen Zustand hat jeder Fluorophor ein charakteristisches Absorptions- und Emissionsspektrum, wobei die Emissionswellenlänge des einen Fluorophores im Absorptionsbereich des anderen liegt. Nähern sich die beiden nun an, kommt es durch die Emission des ersten zur Anregung des zweiten Fluorophors und über den Quotienten der Emissionsintensitäten kann auf die Quantität der Bindungen geschlossen werden. Der strahlungslose Energietransfer erfolgt dabei nicht über elektromagnetische Wellen, sondern mittels Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Die Methode bietet hohe örtliche und zeitliche Auflösung und eignet sich, um physiologische Prozesse wie Wechselwirkungen von Proteinen oder, wie hier, Konzentrationsänderungen von Molekülen nachzuweisen [74].

Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und in Dunkelheit. Es wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop (Eclipse 300 TE, Nikon, Wien) mit einem 40x

Ölimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur (A_N) von 1,3 (CFI Plan Fluor, Nikon, Wien), einem optical beam splitter (535 und 480nm, Dual-View MicroImager™, Optical Insights, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) und einer flüssigkeitsgekühlten charge-coupled device (CCD) Kamera (-30°C, Quantix KAF 1400G2, Roper Scientific, Acton, MA, USA) verwendet (siehe Abbildung 10). Die Anregungswellenlänge wurde mit einem PC-gesteuerten Ludl Filterrad (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) ausgewählt: 415d30 (Omega Optical, Brattleboro, VT, USA). Die Apparate wurden mittels der Metafluor 4.0 Software (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) gesteuert.



Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskop mit Ausstattung: a) Lichtbogenlampe b) Filterrad zur Auswahl der Anregungswellenlänge c) PC zur Steuerung und Bildverarbeitung d) flüssigkeitsgekühlte Kamera e) Perfusionsystem f) Lampe für Weitfeldmikroskopie

2.5.4 ATP-Messung

Zur Messung der mitochondrialen ATP Konzentration ($[ATP]_{\text{mito}}$) dient ein Konstrukt aus mseCFP (einem Abkömmling des *cyan fluorescent Protein*) und mVenus (einer Variation des *yellow fluorescent protein*), welche über die ϵ -Domäne der ATP-Synthase verknüpft sind – das ATeam. ATP bindet dabei an ein Äquivalent der ϵ -Untereinheit der F₀F₁-ATP-Synthase von *Bacillus sp.* (siehe Abbildung 11). Die Vorteile dieses Proteins sind: seine geringe Größe (14kDa), hohe Spezifität für dieses Nukleotid und seine Eigenschaft es nicht zu hydrolysieren. Durch zusätzliche Gensequenzen ist es möglich, ATeam in bestimmte Organellen zu schleusen, etwa in Mitochondrien. Das dazu benötigte Signalpeptid wird nach dem Transport in das Mitochondrium abgespalten und hat so keinen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften [73].

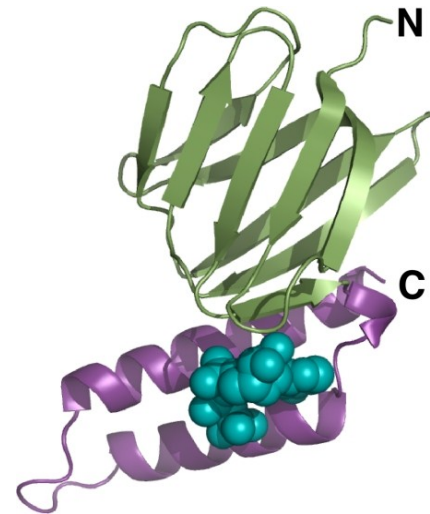


Abbildung 11: ϵ -Untereinheit mit ATP (türkis) aus [73].

Diese FRET basierenden ATP –Sensoren (speziell AT1.03, siehe Abbildung 12) wurden von Hiromi Imamura und seinen Kollegen von der Osaka Universität (Japan) her- und dankenswerterweise für meine Versuche zur Verfügung gestellt.

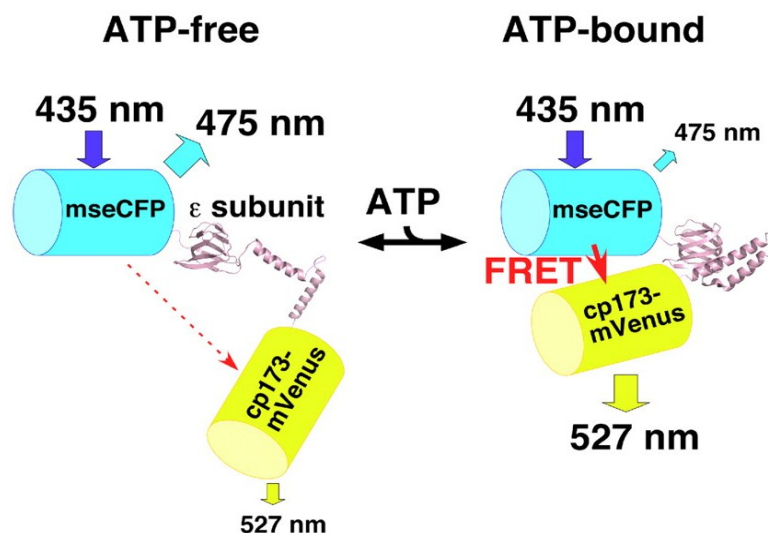


Abbildung 12: Die Fluorophoren von ATeam werden über die ϵ Untereinheit der ATP-Synthase verknüpft. Bei gebundenem ATP liegen sie so nahe beieinander, dass die Emission von CFP mVenus direkt über Dipol-Dipol-Wechselwirkung anregt und der Quotient 527nm/475nm steigt. aus [73].

Die Messungen von $[ATP]_{\text{mito}}$ mittels mitoAT1.03 wurden mit verschiedenen [Glukose] in einem physiologischen Puffer mit 2 mM Ca^{2+} und 138 mM Na^+ (2CaNa-Puffer) durchgeführt.

Zusammensetzung des 2CaNa-Puffers:

138mmol/l NaCl, 5mmol/l KCl, 1mmol/l $MgCl_2$, 10mmol/l HEPES, 2mmol/l $CaCl_2$, pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)

Die anfängliche [Glukose] betrug 3mmol/l.

Dem Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe wurde durch die Berechnung einer Bleichungsfunktion R_0 für jede Zelle mittels einer zweiphasig exponentiellen Regression (GraphPad Prism 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) gemäß dem Quotienten F_{535}/F_{480} Rechnung getragen. Entsprechend wird die [ATP] als $(F_{535}/F_{480})/R_0$ ausgedrückt.

Die Anregung erfolgte mit Licht von 415nm Wellenlänge, die Emission wurde mit einer Digitalkamera (-30°C, Quantix KAF 1400G2, Roper Scientific, Acton, MA, USA) unter Verwendung eines optical beam splitter (535 und 480nm, Dual-View MicroImager™, Optical Insights, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) zur simultanen Detektion von 535 und 480 nm registriert.

2.6 Glukosestimulation vor der Insulinbestimmung

Vor jeder Insulinmessung wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit HBSS gespült und zwei Stunden lang mit glukosefreiem HBSS-Puffer behandelt um die durch Glukose induzierten Mechanismen abzuschalten. Anschließend erfolgte die entsprechende Stimulation nach dem unten stehenden Protokoll.

Zusammensetzung des HBSS-Puffer:

114mM NaCl; 4,7mM KCl; 1,2mM KH_2PO_4 ; 1,16 mM $MgSO_4$; 20mM HEPES; 2,5mM $CaCl_2$; 25,5mM $NaHCO_3$; 0,2% BSA (fettsäurefrei); pH 7,2 (eingestellt mit NaOH)

Protokoll Glukosestimulation und Mercodia[®]-Elisa

- Die Zellen werden in 12-Wells kultiviert. Die besten Ergebnisse erhält man bei submaximaler Konfluenz von etwa 70%, wenn schon erste Zellcluster vorhanden sind.

 - Auf Eis arbeiten, um Insulinproduktion restlicher Zellen zu stoppen und Proben frisch zu halten.
1. Zellen mit 500 µl HBSS waschen
 2. Für 2h in 500µl HBSS ohne Glukose inkubieren
 3. 2x mit HBSS waschen, um Insulinreste zu entfernen
 4. Für 30min Stimulans (Glukose) in HBSS zugeben
 5. Proben entnehmen und auf Eis geben
 6. zentrifugieren (z.B. 4000rpm/5min) um suspendierte noch Insulin produzierende Zellen zu sedimentieren
 7. Proben entsprechend verdünnen (z.B. 1/10)
 8. ELISA wie beschrieben durchführen
 - Enzyme conjugate und wash buffer vorbereiten (entsprechend verdünnen)
 - a. 25µl Calibrator/Sample in die Mikrotiterplatte geben
 - b. 50µl Enzyme conjugate hinzufügen
 - c. 2h auf Plateshaker (z.B. 800rpm)
 - d. 6x mit 350µl wash buffer waschen
 - e. 200µl substrate TMB hinzufügen
 - f. 15min inkubieren
 - g. 50µl stop solution hinzufügen (cave! 0,5M H₂SO₄)
 - h. 5s auf Plateshaker
 - i. Absorption bei 450nm messen

Tabelle 6: Protokoll Glukosestimulation und Mercodia ELISA

2.7 Insulin-Elisa für Ratten (Mercodia)

Zur Quantifizierung der aus INS-1 Zellen sekretierten Insulinmenge diente ein kommerzielles ELISA Kit für Ratteninsulin (10-1124-01, Mercodia AB, Sylveniusgatan 8A, SE-754 50, Uppsala, Schweden). Diese Bestimmungsmethode basiert auf der direkten sandwich Technik. Dabei binden zwei monoklonale Antikörper verschiedene Epitope des Insulinmoleküls. Ein Antikörper ist an die Mikrotiterplatte gebunden, der zweite mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase* HRP) gekoppelt. Während der zweistündigen Inkubation auf einem Plateshaker mit 8000rpm bei Raumtemperatur verquicken Insulinmoleküle die beiden Antikörper. Überschüssiger enzymgekoppelter Antikörper wird mittels mehrfachen Waschens entfernt. Anschließend wird als Substrat der Peroxidase 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin zugesetzt und die Reaktion nach 15 min durch 0,5M Schwefelsäure (H₂SO₄) beendet. Schließlich wird die Absorption bei 450nm bestimmt (Anthos 2010, Biochrom Ltd., Cambridge, UK). Mittels der sechs Insulinstandards (0; 0,15; 0,4; 1,0; 3,0 und 5,5 µg/l) wurde bei jedem Messdurchgang eine Kalibrierungskurve erstellt und auf die tatsächlich ausgeschüttete Insulinmenge geschlossen.

2.8 Normalisierung der Insulinproduktion

Um die Insulinsekretion pro Well bei unterschiedlicher Konfluenz und Sekretionsleistung der Zellen vergleichbar zu machen, wurden verschiedene Methoden zur Normalisierung evaluiert.

2.8.1 Photographie

Vor Beginn der Versuche wurden digitale Bilder der Zellen angefertigt. Diese wurden mittels eines Adapters über das Okular eines invertierten Phasenkontrast Durchlichtmikroskops (Nikon TMS-F, Nikon, Wien) mit einer Nikon coolpix 4500 Digitalkamera unter 10facher Vergrößerung aufgenommen. Zum Vergleich derselben Region wurde der Wellboden mit wasserfestem Stift markiert. Dadurch ließ sich der Ausschnitt leicht erneut aufnehmen (siehe Abbildung 17).

2.8.2 Membranoberfläche

Die Konfluenz der Zellen auf den Digitalbildern wurde mit der Bildbearbeitungssoftware MetaMorph analysiert. Hierzu werden die Bilder in Grauwerte transformiert und der Anteil an Zellgrenzen, die sich als helle Areale demarkieren an der Gesamtfläche durch Wahl eines geeigneten Grenzwertes bestimmt. Das Ergebnis wird als Anteil an der Gesamtfläche der Aufnahme ausgedrückt.

2.8.3 Zellzahl

In Relation zur Zellzahl lässt sich die Insulinproduktion in der Größenordnung von $\text{ng}/10^6$ Zellen angeben. Die Zellzahl pro Well wurde durch Suspension der Zellen mittels Trypsin und anschließendem Auszählen in einer Zählkammer (Neubauer $0,0025\text{mm}^2$, $0,100\text{mm}$ Tiefe) bestimmt. ($n(16 \text{ Quadrate}) * 10000 = \text{Zellen/ml}$) Dies liefert eine Angabe im Bereich [$\text{ng}_{\text{Insulin}}/10^6 \text{ Zellen}$].

2.8.4 Proteinbestimmung mittels Bradford

Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Insulinmenge bezüglich der Gesamtproteinmenge und damit proportional der Zellmasse anzugeben. Hierzu wurden die Zellen mit $0,3\text{M}$ NaOH über eine Stunde lysiert, das Lysat verdünnt, mit dem $1/5$ verdünnten Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, München, Deutschland) versetzt und nach 15minütiger Inkubation die Absorption bei 595nm photometrisch gemessen (Spektrophotometer DU 800, Beckman & Coulter Inc., Brea, CA, USA). Als Referenz dienen verschiedene Konzentrationen an bovinem Serum-Albumin (BSA), welche Bestandteil des Bio-Rad Protein Assay waren (Bio-Rad, München, Deutschland).

Beim Bradford Assay bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine, was sein Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm ändert [75].

Der Farbstoff kommt als Kation, neutral oder als Anion vor. In letzterer bildet er über van-der-Waals-Bindungen Komplexe mit Proteinen und zwar hauptsächlich mit Argininresten oder anderen primären Aminen [76].

Die Proteinbestimmung in INS-1 Zellen wurde nach dem untenstehenden Protokoll durchgeführt.

Protokoll Proteinnachweis mit Bradford-Assay im 12 Well

Benötigt wird:

- 0,3M NaOH
- BSA-Standard:

Konzentration [g/l]	1	½	1/3	¼	1/6
Verdünnung aus stock 1g/l	1	1+1	1+2	1+3	1+5

- Bradford-Reagenz verdünnt 1+4
 - Küvetten
1. Wells absaugen, + 500µl 0,3M NaOH für 1h auf Shaker
 2. +500µl NaOH (/H₂O) auf 1ml/Well verdünnen
 3. 15µl Probe + 750µl Bradford-Reagenz ad Küvette
 4. Messung der Absorption bei 595nm

Tabelle 7: Protokoll Bradford

2.8.5 MTT

MTT steht für 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, ein gelbes Tetrazoliumsalz, welches in gesunden Zellen zu blauem Formazan reduziert wird. Dies geschieht durch die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH, welche im Rahmen des Energiestoffwechsels der Zelle erzeugt werden. Der Test liefert also Hinweise auf Zellzahl und -aktivität [77].

Der MTT-stock (5g/l MTT (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO,USA) in H₂O) wurde mit INS-Kulturmedium 1/10 verdünnt und jedes Well mit je 1ml für drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1ml kaltem PBS-Medium gewaschen und mit 250µl Lysisbuffer (Isopropanol mit 0,04M HCl) für 15min bei 800rpm auf dem Plateshaker behandelt. Schließlich wurde die Absorption bei 572 und 650nm photometrisch (Victor 1420, EG&G Wallac, Gaithersburg, MD, USA) gemessen.

Folgende Medien bzw. folgendes Protokoll wurden verwendet.

Zusammensetzung PBS-Medium:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 1mM MgCl₂, 8mM NaHPO₄, 2mM CaCl₂, pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)

Protokoll Zell-Viability MTT-Assay

Benötigt wird:

- Lysisbuffer
- MTT (10x)
- PBS (kalt)
- Kulturmedium

1. MTT mit Kulturmedium verdünnen
2. Je Well + 1ml MTT für 3h
3. Waschen mit kaltem PBS 1ml/Well
4. +250µl Lysisbuffer (Isopropanol mit 0,04M HCl)
5. Plateshaker für 15min
6. Messung der Absorption bei 572 & 650nm

Tabelle 8: Protokoll MTT-Assay

2.9 Statistik

Die Statistische Signifikanz der Ergebnisse ($P < 0,05$) wurde mittels t-Test dargelegt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm SEM präsentiert. (GraphPad Prism 5.00 Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Reaktion von INS-1 Zellen auf Glukose und Validierung der Methodik

Im ersten, experimentellen Teil dieser Diplomarbeit ging es darum, die vorhandene β -Zelllinie bezüglich ihrer Glukosesensitivität zu charakterisieren. Obwohl INS-1 Zellen als probates Modell zur Untersuchung der GIDS in der Literatur beschrieben sind [66], hängt die Brauchbarkeit dieser insulinproduzierenden Zellart von mehreren Faktoren ab. Wichtige Faktoren, welche das Genexpressionsmuster und somit die Insulinsensitivität dieser Zellen beeinflussen können, sind einerseits die Zellkultur (Zellkulturbedingungen, Medium,...), das Zellalter (Passageanzahl) und andererseits der Ausgangszellklon [67]. Die für diese Arbeit verwendeten INS-1 Zellen stellen eine Mischung verschiedener

Zellklone mit wahrscheinlich unterschiedlicher Glukoseempfindlichkeit dar (persönliche Mitteilung Frau Dr.ⁱⁿ Ismene Fertschai bzw. Univ.-Prof. Dr. Markus Ritter). Zur Charakterisierung dieses möglicherweise heterogenen Materials wurden sowohl Einzelzellmessungen als auch Messungen mit großen Zellpopulationen herangezogen. Folgende Ansätze wurden zur Bestimmung der Glukoseempfindlichkeit von INS-1 Zellen verwendet:

- Messung der Veränderung der mitochondrialen ATP Konzentration in einzelnen INS-1 Zellen bei Variationen der extrazellulären Glukosekonzentrationen (⇒ 3.1.1)
- Aufnahmen von Zellformänderungen unter verschiedenen Glukosekonzentrationen (⇒ 3.1.2.)
- Messung von morphologischen Veränderungen von Mitochondrien in INS-1 Zellen mit Hilfe der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie unter verschiedenen Glukosekonzentrationen (⇒ 3.1.3.)
- Direkte Messung der Insulinausschüttung mittels ELISA (⇒ 3.1.6.)

3.1.1 Die Stimulation von INS-1 Zellen mit Glukose führt zu einem signifikanten Anstieg der mitochondrialen ATP-Konzentration in einzelnen INS-1 Zellen

Um in einzelnen INS-1 Zellen Veränderungen der $[ATP]_{mito}$ bei Stimulierung mit Glukose messen zu können, wurden die Zellen, welche nach entsprechender Transfektion mitoAT1.03 gebildet hatten, am Fluoreszenzmikroskop vermessen. Bei einer Konfluenz

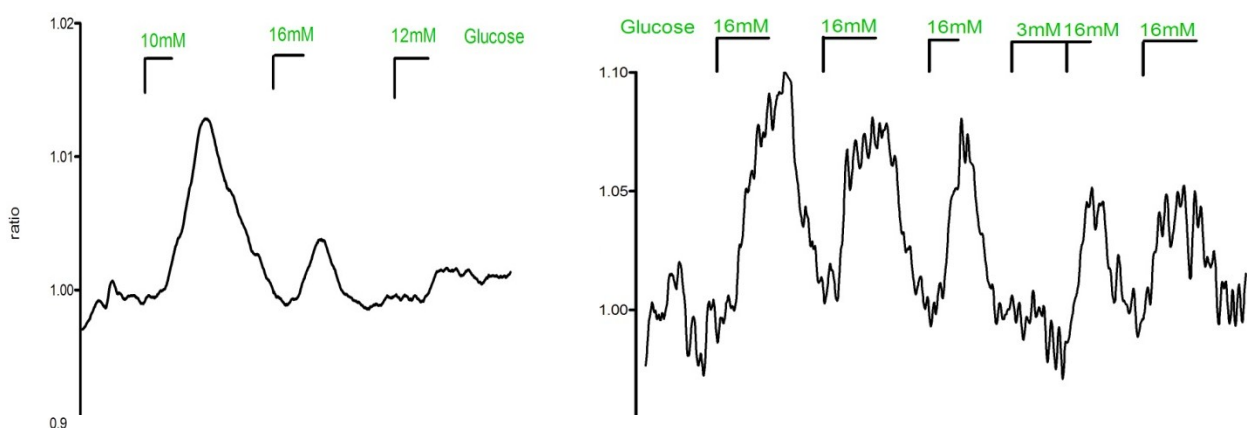


Abbildung 13: Stimulation mit $[Glucose] \geq 10mM$ zeigt einen deutlichen mitochondrialen $[ATP]$ -Anstieg. Bei 3mM ist kein Effekt zu sehen.

von etwa 40% waren etwa 50% der Zellen transfektiert und exprimierten das Konstrukt.

Jedoch zeigte nur ein kleiner Teil davon (etwa 5%) ein typisch mitochondrielles Muster. In den restlichen Zellen war die Fluoreszenz im Zytoplasma zu sehen. Weiterhin gab es eine große Variationsbreite in der Intensität, mit der die jeweiligen Zellen fluoreszierten. Für die Messungen wurden Zellen mit einem deutlichen mitochondriellen Muster und einer möglichst großen Helligkeit ausgewählt. Als region of interest (ROI) wurden die perinukleären, fluoreszierenden Regionen definiert. Es zeigte sich ein schneller, deutlicher Anstieg der $[ATP]_{mito}$ bei Stimulation mit $[Glukose] \geq 10mM$ (Abbildung 13). Bei 3mM war keine Änderung der $[ATP]_{mito}$ zu beobachten.

Unter den gemessenen Zellen, die eine Reaktion auf Glukose zeigten, ließen sich zwei Typen unterscheiden. Einerseits Exemplare, die auch nach mehrmaliger Stimulation noch eine adäquate Antwort zeigten (Typ Mehrmalig) und andererseits solche, deren Antwort nach der ersten Reaktion stark nachließ (Typ Einmalig) siehe folgende Tabelle 9.

n=12	Typ Mehrmalige	Typ Einmalige Antwort
Anzahl	6	6

Tabelle 9: Unterschiedliche Reaktion verschiedener Zellen auf mehrfachen Glukosereiz. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass manche Zellen wiederholt auf Reizung mit Glukose mit einem Anstieg der $[ATP]_{mito}$ reagierten (Typ Mehrmalig). Andere jedoch zeigten nach einer initialen, oft deutlichen Antwort keine weitere Reaktion auf folgende Reize und wurden dem Typ Einmalig zugeordnet.

Dieses Ergebnis weist auf verschiedene Klone mit unterschiedlicher Glukoseempfindlichkeit unter den INS-1 Zellen hin. Weitere Versuche sind notwendig um herauszufinden, ob das Verhältnis der Verteilung der glukosesensitiven Subpopulationen unter den INS-1 Zellen bezüglich der wiederholten Steigerung der $[ATP]_{mito}$ tatsächlich 1/1 beträgt.

3.1.2 Der Anstieg der mitochondriellen ATP Konzentration erfolgt etwa doppelt so schnell, wie sein Abfall

Eine genauere Analyse der FRET Messungen ergab ferner, dass der Anstieg der $[ATP]_{mito}$ etwa doppelt so schnell wie ihr Abfall erfolgte. Dies lässt sich auch durch lineare Regression der Kurven zeigen (Abbildung 14). Die Zeit von Stimulationsbeginn bis zur maximalen Antwort variiert von 50 bis 100 Sekunden; der Abfall auf Normalniveau dauert etwa 150 bis 200 Sekunden.

Dieses Verfahren eignet sich gut zur Bestimmung der Glukoseempfindlichkeit einzelner Zellen. So lässt sich ein entscheidendes Charakteristikum der GDIS gut darstellen und etwa der Einfluss von Proteinen, Wirkstoffen oder Elektrolytkonzentrationen schnell und

mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung feststellen.

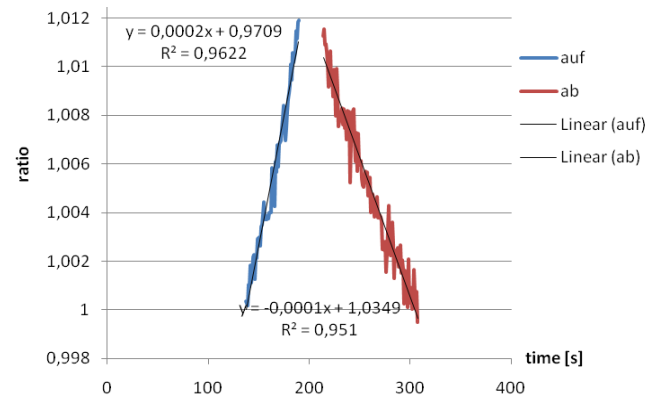


Abbildung 14: Anstieg und Abfall der $[ATP]_{mito}$ mit Trendlinien und deren Funktion.

3.1.3 Mechanische Reizung erhöht $[ATP]_{mito}$ in INS-1 Zellen

Im Zuge der $[ATP]_{mito}$ Messungen in einzelnen INS1 Zellen konnte ein interessantes Phänomen beobachtet werden:

Bei einem Experiment erhöhte die Steigerung des Pegels im Pufferbehälter den Fluss des Experimentpuffers die Zellen in der Kammer hinweg von etwa 1,5 auf 2 ml/min. Infolge dieser mechanischen Reizung zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Signals simultan bei allen beobachteten Zellen (Abbildung 15).

Diese Beobachtung weist auf eine glukoseunabhängige Insulinausschüttung bei mechanischer Reizung von β -Zellen hin. Weitere Versuche sind notwendig, um diesen Aspekt genauer zu beleuchten.

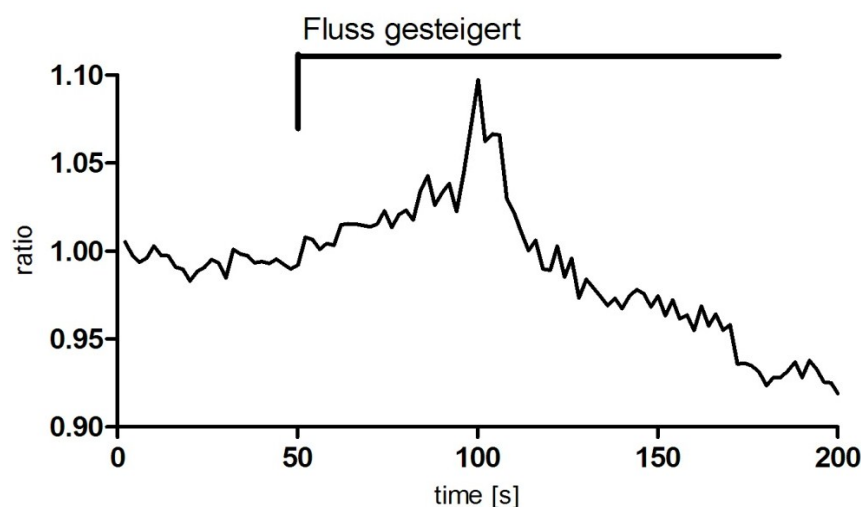


Abbildung 15: Nach Erhöhung des Pufferflusses zeigt sich ein deutlicher Anstieg der $[ATP]_{mito}$

3.1.4 unter HBSS mit 0mM Glukose ändert sich die Morphologie der Zellen

Da das Kulturmedium 10mM Glukose enthält, wurden die INS-1 Zellen zur Vorbereitung auf die Glukosestimulation für 2 Stunden HBSS Medium mit 0mM Glukose ausgesetzt. Dabei zeigte sich eine deutliche Änderung ihrer makroskopischen Morphologie. Waren die Zellen im Kulturmedium kugel- bzw. spindelförmig mit zwei charakteristischen schmalen gegenüberliegenden Ausläufern (Abbildung 16a), zeigen sie im glukosefreien HBSS-Medium ein planes Aussehen und gehen eine flächigere Verbindung mit dem Schalenboden ein (Abbildung 16b).

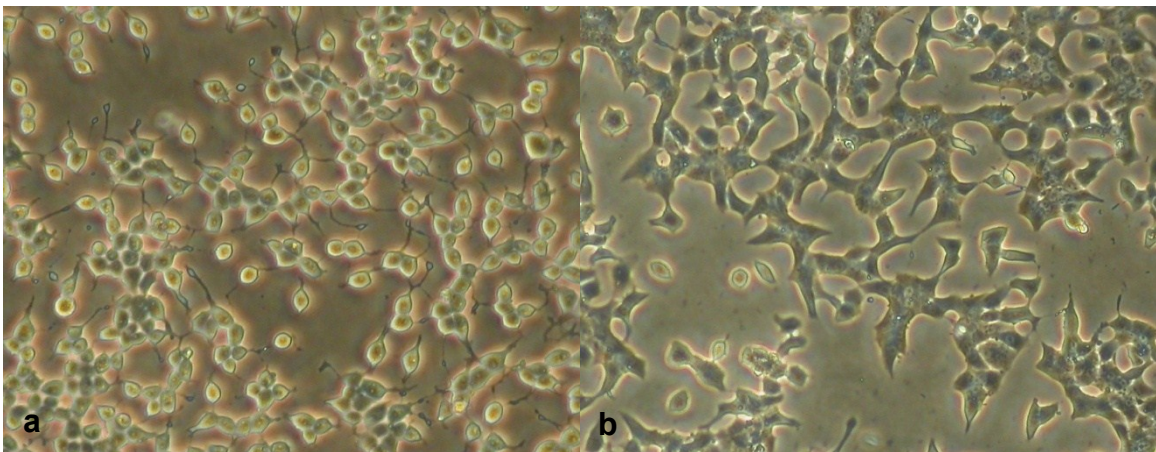


Abbildung 16: a: vor HBSS in INS-Kulturmedium; b: nach 2h HBSS 0mM Glukose

Die folgende Stimulation mit Glukose hat auf die Morphologie keinen weiteren Einfluss (Abbildung 17).

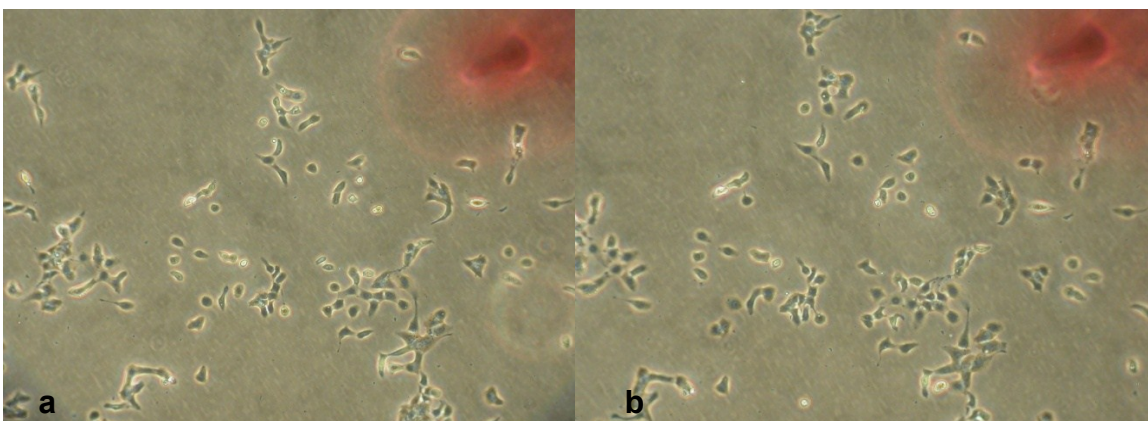


Abbildung 17: a: vor; b: nach 2h mit 10mM Glukose in HBSS (rot: Markierung auf Wellboden)

3.1.5 Hohe Glukosekonzentration lässt Mitochondrien fragmentieren

Um den Einfluss der extrazellulären Glukosekonzentration auf das Erscheinungsbild der Mitochondrien zu untersuchen, wurden die Mitochondrien in INS-1 Zellen mittels MitoTracker green an einem hochauflösenden Laser Array Scanning Mikroskop visualisiert. Die Zellen befanden sich nach Entnahme aus dem Kulturmedium in einem physiologischen Puffer (2CaNa-Puffer), der 10mM Glukose enthielt. Unter diesen Bedingungen lagen die Mitochondrien in den meisten INS-1 Zellen fragmentiert vor mit zahlreichen sphärischen Partikeln (Abbildung 18a). Nach 8 Minuten in glukosefreiem Medium zeigten sie deutliche Veränderungen hin zu linearen Strukturen, die kleinen Abschnitte waren verschwunden und sind in strangförmige Gebilde übergegangen (Abbildung 18b). Es ist bekannt, dass Ca^{2+} -Einstrom in Mitochondrien, deren Fragmentierung auslöst [78]. Im Medium mit 10mM Glukose findet durch die Stimulation ein Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und deren Mitochondrien statt und erklärt deren fragmentierte Morphologie. Mit dem glukosefreien Medium entfällt der Stimulus, es kommt zu keinem weiteren Ca^{2+} -Einstrom und die Mitochondrien der β -Zelle zeigen das Aussehen analog dem unstimulierter Zellen mit elongierten, fadenförmigen Kompartimenten ohne Sphären oder Loops. Versuche mit Ca^{2+} freien Puffern wurden noch nicht durchgeführt. Solche Versuche könnten zur Überprüfung der oben angeführten Hypothese herangezogen werden.

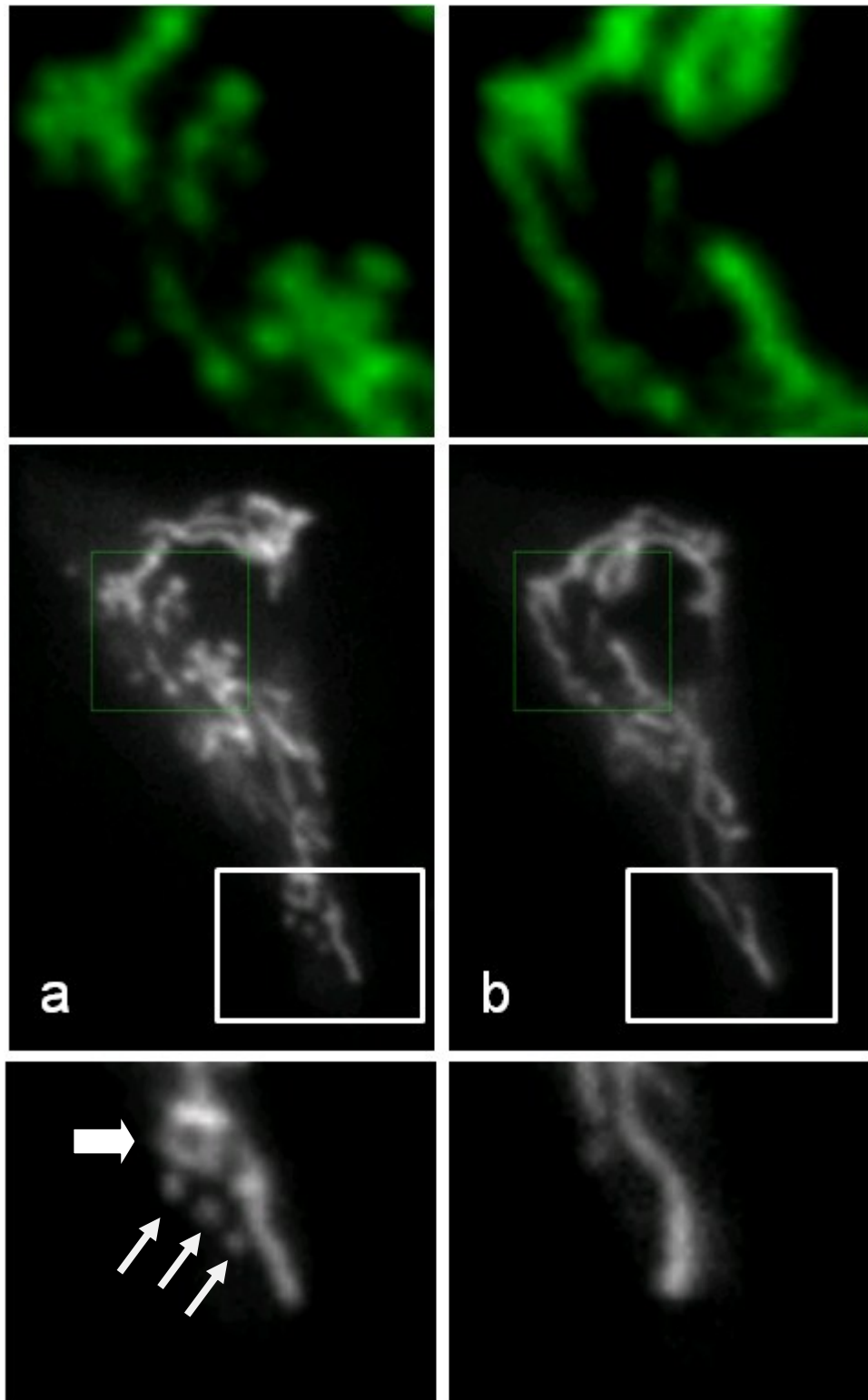


Abbildung 18: Mitochondrien mit 10mM (a) und ohne Glukose (b) nach 8 Minuten. Die Bilder ober- und unterhalb zeigen jeweils die grünen und weißen Ausschnitte in Vergrößerung. Unter Glukose (a) zeigt die Zelle die charakteristischen Zeichen fragmentierter Mitochondrien. Man erkennt verschiedene, isolierte Abschnitte, die sich zu kleinen Sphären ballen (schmale Pfeile↗), sowie eine typische lassoförmige Loop-Struktur (dicker Pfeil⇒). In glukosefreiem Medium (b) präsentieren sich die Mitochondrien als tubuläres, verzweigtes Netzwerk.

3.1.6 Stimulation von INS-1 Zellen mit 16mM Glukose über zwei Stunden steigert signifikant die Insulinproduktion

Die ersten Versuche zur Insulinsekretion wurden mit INS-1 Zellen niedriger Konfluenz (30%) durchgeführt. Untersucht wurde die [Insulin] im Überstand des Mediums. Zur Normierung diente die Zellzahl. Eine Stimulation erfolgte nach zwei Stunden glukosefreien Mediums mit 16mM Glukose für weitere zwei Stunden. Da die Proben unverdünnt verwendet wurden, ergab die Absorptionsmessung auch bei den unstimulierten Kontrollen Werte außerhalb des Messbereiches. Im Folgenden lieferte



Abbildung 19: Die mit 16mM Glucose über 2 Stunden stimulierten Zellen weisen eine signifikant höhere ($P < 0,0001$) Insulinproduktion auf. ($n=6$)

eine Verdünnung von 1/10 mit HBSS interpretierbare Ergebnisse. Die Proben wurden bei 0°C aufbewahrt, verdünnt und nach 24h erneut gemessen. Die Ergebnisse waren zufriedenstellend und eine Aufbewahrung der Proben und spätere Messung scheint zulässig. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Insulinproduktion bei einer Stimulation mit 16mM Glukose von zwei Stunden Dauer (Abbildung 19).

Bei weiteren Experimenten fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der [Glukose] und Insulinfreisetzung, lediglich zeitabhängig stieg die [Insulin]. Proben wurden nach 5, 15, 30 und 120 Minuten aus den Wells entnommen und unverdünnt gemessen, was zu Ergebnissen außerhalb des Toleranzbereichs des Photometers führte. Die Verdünnung dieser bereits prozessierten Proben lieferte sinnvolle Ergebnisse, die jedoch nur bedingt verwertbar sind. Im Folgenden wurden weitere Waschschrte vor der Stimulation durchgeführt, um verbliebenes Insulin zu entfernen. Die Stimulationsdauer wurde von zwei Stunden auf 30 Minuten gesenkt.

Bei Normalisierung mittels MTT ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen nach 30 und 120 Minuten (siehe Abbildung 20). Ohne Normalisierung ist er jedoch hoch signifikant. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Normalisierung mittels MTT aufgrund der eigenen Streuung inkonsistente Ergebnisse bedingt, was den Wert dieser Anwendung mindern würde.

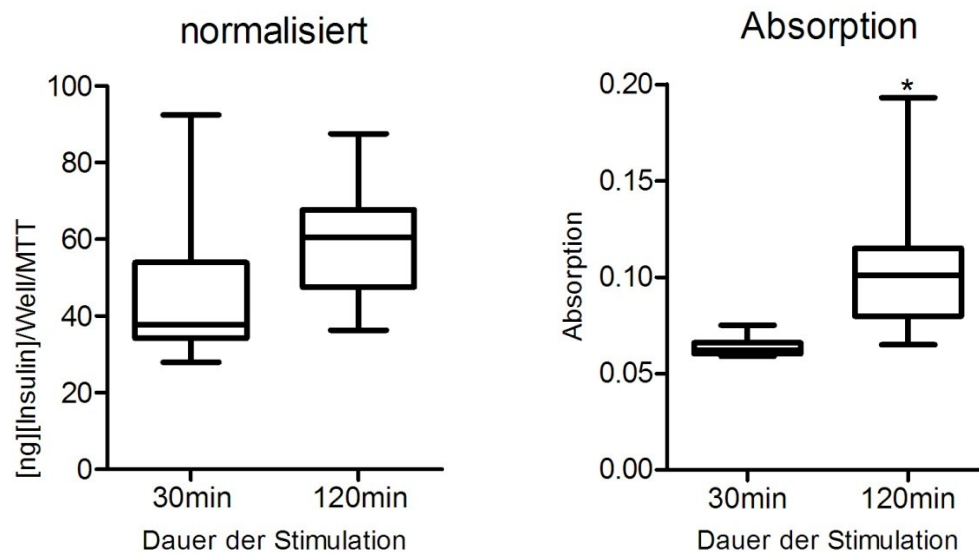


Abbildung 20: auf MTT normalisierte Ergebnisse und reine Absorptionswerte. Bei den normalisierten Werten lässt sich kein Unterschied feststellen (n=12, P=0,0534), bei den Absorptionswerten sind sie hoch signifikant. (n=12, P=0,0003)

3.1.7 Fehlende Waschschrirte verhindern die Registrierung der glukoseabhängigen Insulinsekretion

Bei manchen Versuchen war keinerlei Abhängigkeit der Insulinsekretion von der [Glukose] nachzuweisen. Lediglich ein Anstieg der Insulinmenge über die Zeit war festzustellen (siehe Abbildung 21). Um zu hohe Restinsulinmengen, die zwischen den Zellen verblieben waren, zu eliminieren, wurden zwei weitere Waschschrirte vor der Stimulierung eingeführt.

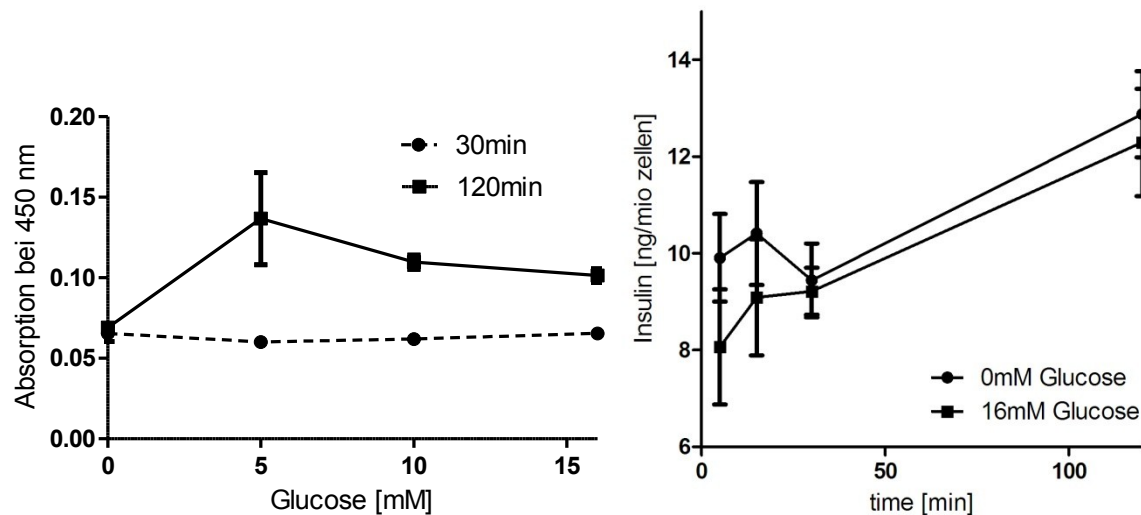


Abbildung 21: Bei Stimulation mit verschiedenen [Glucose] ist bei ungewaschenen Zellkulturen kein Zusammenhang mit der Insulinsekretion festzustellen, lediglich eine zeitabhängige Steigerung.

Durch Messung unmittelbar nach Stimulation (etwa eine Minute) ließ sich das residuale Insulin quantifizieren. Es handelte sich dabei um hohe Werte im Bereich von $10 \text{ ng}/10^6$ Zellen (siehe Abbildung 22). Allerdings kann eine Stimulation der Insulinsekretion durch die mechanische Reizung, welche beim Waschen geschieht, nicht ausgeschlossen werden (vgl. 3.1.3 und Abbildung 15). Eine nennenswerte Insulinproduktion in der kurzen Zeit bis die Proben entnommen wurden, ist unwahrscheinlich und es konnte auch keine Steigerung durch Glukosestimulation nachgewiesen

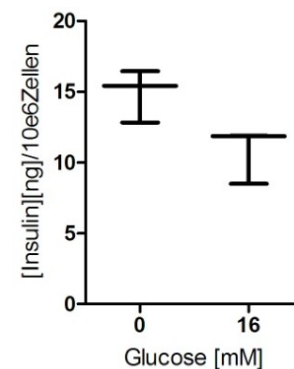


Abbildung 22: Die [Insulin] nach einer Minute beträgt bereits $>10 \text{ ng}/10^6$ Zellen. Eine Stimulation durch Glucose ist nach dieser Zeit nicht festzustellen. (n=3)

werden. Dies zeigt erneut die Notwendigkeit, das verbliebene Insulin vor der Stimulation durch Waschschrte zu entfernen. Dabei ist unbedingt auf eine schonende Vorgehensweise zu achten, da die Zellen nur schwach am Untergrund haften und durch unvorsichtiges Absaugen und v.a. Spülen leicht abgewaschen werden.

3.1.8 Zellanzahl, MTT und die Messung der Membranfläche verhalten sich proportional zur Konfluenz

Bei einem Versuch wurden die Zellen mit zunehmender Konfluenz in einem 12-Well ausgesetzt und die Normalisierung erfolgte abwechselnd mit Zählkammer und MTT-Assay. Außerdem wurde anhand der Photographien über die Membranoberfläche die Konfluenz bestimmt (Abbildung 23).

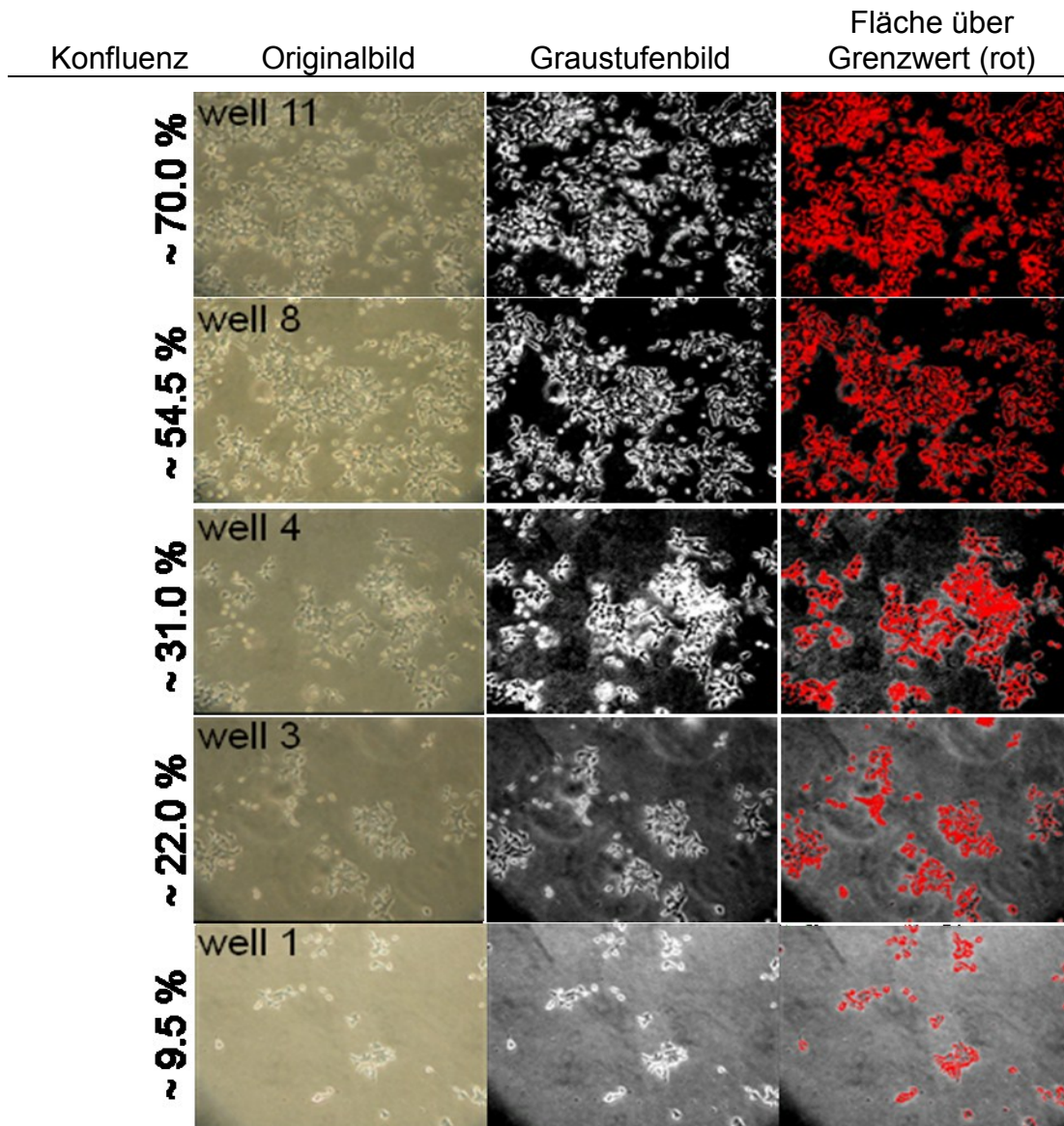


Abbildung 23: Messung der Konfluenz über Graustufen und Grenzwert. Die linke Bildreihe zeigt die Originale, wie sie in 2.8.1 (Photographie) beschrieben aufgenommen wurden. In der Mitte sind die in Grauwerte überführten Aufnahmen zu sehen. Rechts sind schließlich durch die Wahl eines Grenzwertes die hellen Bereiche der Zellgrenzen rot dargestellt. Sie entsprechen näherungsweise der Fläche an Zellmembran, die als Anteil an der Gesamtfläche links abzulesen ist.

Sowohl MTT als auch Zellanzahl stiegen kontinuierlich mit der Konfluenz in den Wells an (Abbildung 24). Die Ergebnisse des MTT zeigen einen stärker linearen Verlauf im Vergleich zur Zellzahl. Allerdings fällt deren Ausreißer exakt auf einen Abfall bei der stimulierten Insulinsekretion, wobei für dieses Well kein MTT-Wert vorliegt, welcher den Ausreißer möglicherweise ebenso detektiert hätte. Das basale Insulinlevel steigt auch bei hoher Konfluenz nicht an, bzw. entsprechen die Werte einer [Insulin] von 0. Also erfolgt ohne Glukose auch keine Insulinsekretion. Steigende Konfluenz geht mit steigender Insulinproduktion einher – mehr Zellen produzieren mehr Insulin. Die Bestimmung der

Konfluenz über die Software liefert Werte, die sehr gut mit den Ergebnissen von MTT und Zellanzahl übereinstimmen. Die Konfluenzmessung vermeidet einige wesentliche Probleme, die bei den biochemischen Methoden inhärent sind (Pipettieren, Verdünnen, Messungenauigkeiten, abgelaufene Chemikalien, etc.). Dafür können Fehler anderer Art geschehen (etwa wenn die Grenzwerte subjektiv anders bzw. abweichend gelegt werden) und das Verfahren ist nur geeignet, falls die Zellen völlig homogen in den Wells verteilt sind. Es stellt also hohe Anforderungen an die Zellkultur.

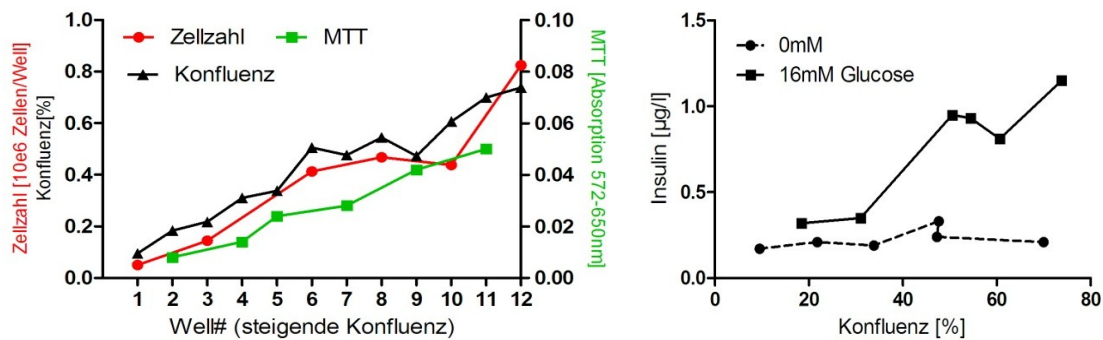


Abbildung 24: links: steigende Konfluenz ist proportional zu Zellanzahl und MTT-Umsatz. Die Kurve des MTT ist konsistenter, jedoch passt der Ausreißer der Zellzahl in Well 10 genau zu dem der stimulierten Insulinsekretion. rechts: Die unstimulierten Zellen zeigen keine Insulinproduktion, die der stimulierten wächst mit steigender Konfluenz.

Eine Normalisierung auf die [Protein] wurde mit dem Bradford-Assay durchgeführt. Dabei erwiesen sich Verdünnungen von 1/100 und 1/50 als erheblich zu stark. Geeignet ist bei 12-Well Platten eine Verdünnung von 1+1 direkt im Well. Dabei ergaben sich erstaunlich hohe Werte in der Größenordnung mg Insulin pro g Gesamtprotein.

3.1.9 Die [Glukose] steht zur Insulinproduktion in einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung.

Die EC₅₀ liegt zwischen 3 und 5 mM Glukose. Zur Stimulierung wurden Konzentrationen von 0 bis 16 mM Glukose verwendet (Abbildung 25).

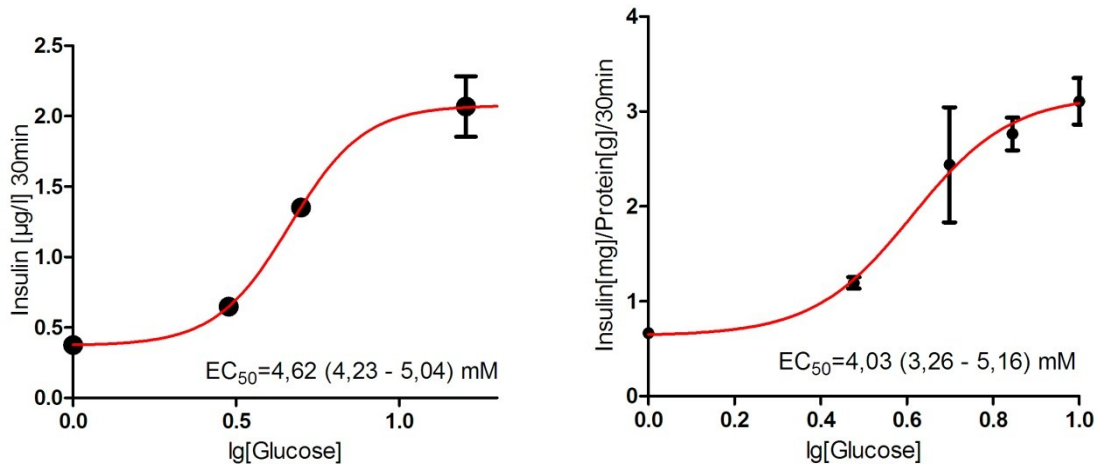


Abbildung 25: Dosis-Wirkung Beziehung zwischen [Glukose] und Insulinsekretion

Bei Probeentnahmen aus dem gleichen Well zu verschiedenen Zeitpunkten zeigten sich nach Berücksichtigung der Volumendifferenz höhere Insulinwerte als in den Kontrollen. Teilweise mag dieser Effekt auf die mechanische Irritation zurückzuführen sein (vgl. 3.1.3 und Abbildung 15). Er fällt insbesondere in Wells ohne Glukosestimulation stark aus.

3.1.10 Die stimulierte Insulinsekretion nimmt über die Zeit zu.

Die Zunahme der Insulinsekretion über die Zeit lässt sich auf eine durch die Stimulation gesteigerte Insulinsyntheseleistung der Zelle erklären. Der Peak in den ersten 5 Minuten, entsprechend der Insulinantwort auf den Glukosebolus, wie in 1.1.2.2.5 beschrieben, war nicht nachzuweisen. Es ist möglich, dass er bei diesem Zellmodell verloren ging, oder dass er in vivo von anderen extrazellulären Faktoren ausgelöst wird (Abbildung 26).

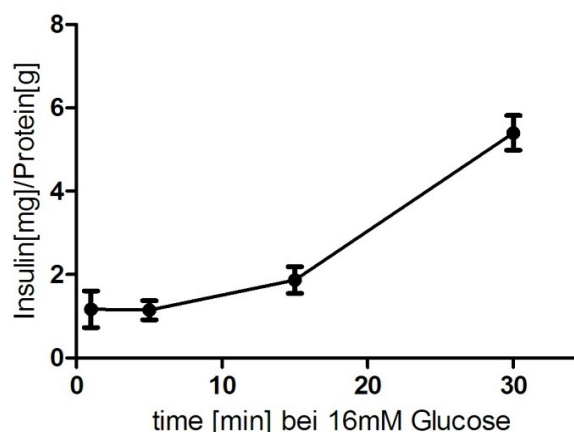


Abbildung 26: Zeitabhängige Insulinsekretion unter Glukosestimulation

3.1.11 MTT Ergebnisse sind abhängig von der [Glukose]

Der MTT-Assay ist ein Indikator für Zell „viability“ - also Lebensfähigkeit. Er ist einerseits proportional zur Zellanzahl und andererseits zur metabolischen Aktivität. Da diese wiederum von der Versorgung der Zelle mit Nährstoffen wie Glukose korreliert, ließ sich eine signifikante Abhängigkeit des MTT-Wertes von der Glukosestimulation zeigen (Abbildung 27).

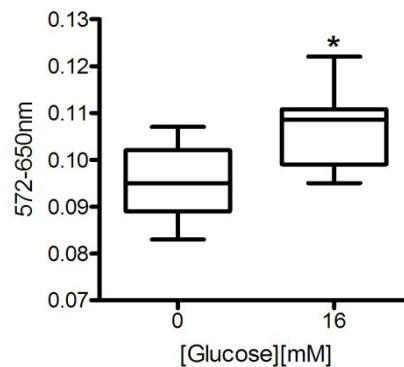


Abbildung 27: MTT-Ergebnisse bei 0 und 16 mM Glukose im Medium. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung der MTT-Werte unter den mit Glukose behandelten Zellen. (n=13, p=0,0004)

3.1.12 Auswahl des Normalisierungsverfahrens

Als geeignete Normalisierungsmethode wurde schließlich die durchschnittliche Zellanzahl gewählt. Dabei wird auf eine möglichst gleichmäßige Zellaussaat geachtet um rein verfahrenstechnisch eine geringe Varianz zu erreichen. So kann exemplarisch die Zellanzahl in einem Well für den gesamten Versuch verwendet werden. Außerdem ist es möglich bereits beim Transfer der Zellen in die Versuchswells ihre Dichte durch Auszählen zu bestimmen und so auch bei aufeinanderfolgenden Versuchen über Wells mit identischer Konfluenz zu verfügen.

3.2 Variation des Expressionslevels von *STIM1* und *Orai1*

3.2.1 Subzelluläre Lokalisation von *STIM1* und *Orai1* in INS-1 Zellen

Die folgenden Aufnahmen (Abbildung 28) stammen von einer mit *STIM1*-YFP und *Orai1*-CFP transfektierten INS-1 Zelle und wurden vermittels eines hochauflösenden Laser Array Scanning Mikroskop dargestellt. Dieses Experiment zeigte die erwartete Verteilung beider

Proteine: STIM1 im ER bzw. in „*punctae*“ in subplasmalemalem ER-Bereichen und Orai1 in der PM in INS1-Zellen.

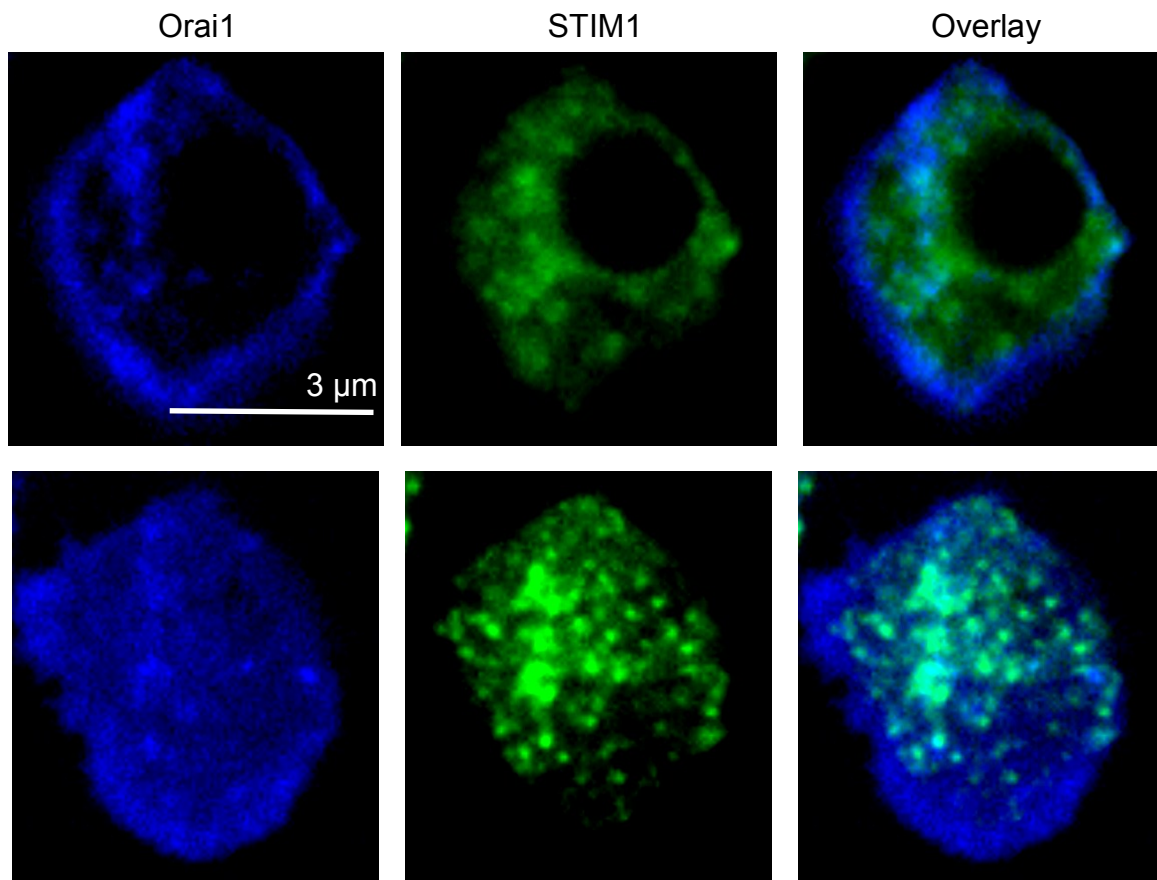


Abbildung 28: STIM-YFP und Orai-CFP im konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Die Aufnahmen der oberen Zeile zeigen Schnitte parallel zum Untergrund etwa durch die Mitte der Zelle. In der unteren Zeile sind Aufnahmen der Zellbasis zu sehen. Orai liegt in der PM und daher an den Zellgrenzen lokalisiert, STIM im ER, also im Bereich des Zytoplasmas. Basal sind die Ballungen von STIM in s.g. *puncta* zu erkennen.

3.2.2 Glukosestimulation führt zu transienter subplasmalemaler STIM Aggregation

Bei einer Zelle in Puffer mit 0mM Glukose ließ sich mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ein STIM-Cluster unter der PM darstellen. Dieser reagierte auf die Stimulation mit Glukose anfangs mit einer Intensitätsverstärkung, was für die Ansammlung weiterer STIM-Proteine spricht, später jedoch mit einem vollständigen Intensitätsverlust. Nach 5 min war er nicht mehr nachzuweisen (Abbildung 29). Diese transiente Aktivierung und Aggregation von STIM infolge der Glukosestimulation spricht für einen Abfall der $[Ca^{2+}]_{mito}$ und Aktivierung des SOCE.

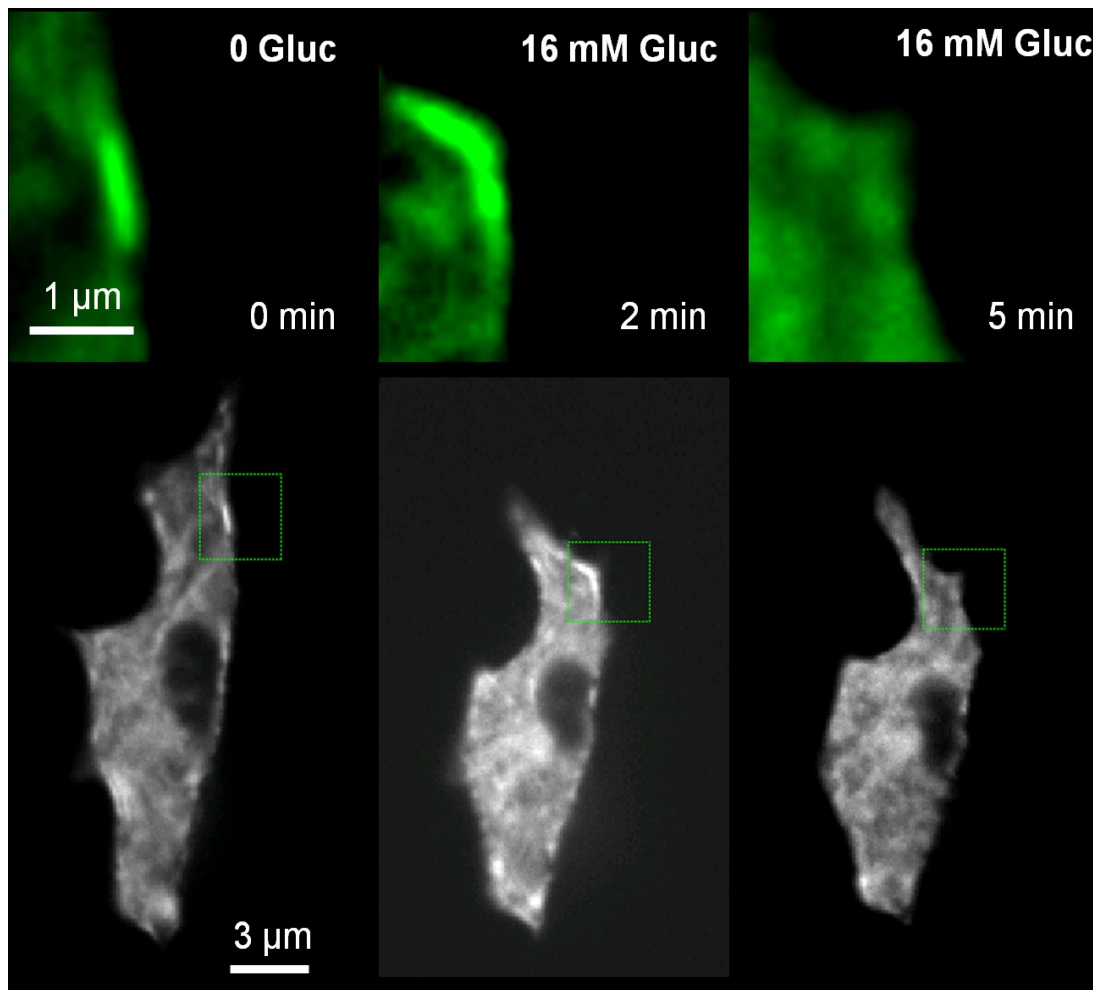


Abbildung 29: INS-1 Zelle bei $t=0$, 2, 5 min nach Pufferwechsel von 0 auf 16mM Glukose, transient transfiziert mit pESTIM-YFP. In den Ausschnitten ist die Intensitätsverstärkung des STIM-Clusters und sein anschließendes Verschwinden zu sehen.

3.2.3 Eine Transfektionsdauer von zwei Tagen ist zu lange und liefert keine brauchbaren Ergebnisse

Die Messung der Insulinreaktion auf die Überexpression von STIM1 & Orai1 sowie den Knockdown von STIM via siRNA lieferten anfangs (nach Inkubation über zwei Tage) keine brauchbaren Ergebnisse (siehe Abbildung 30). Im Folgenden wurde die Inkubationsdauer auf einen Tag reduziert. Als Erklärung sind Zellschäden durch die Transfektion möglich. Allerdings wäre auch eine Apoptoseinduktion durch den Ca^{2+} -Einstrom infolge der STIM-Überexpression in Betracht zu ziehen, was aber aufgrund der homogenen Verteilung der restlichen Ergebnisse unwahrscheinlich ist.

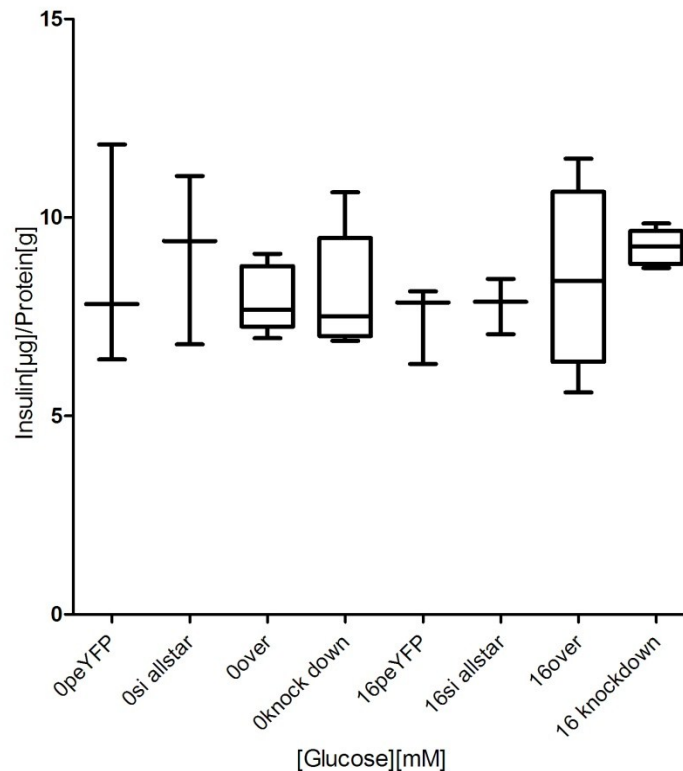


Abbildung 30: Keine Reaktion auf Glukose bei Transfektion und Inkubation über zwei Tage. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Konditionen nachzuweisen.

3.2.4 Sowohl STIM1 Knockdown als auch STIM1/Orai1 Überexpression führt zu verringerter GDIS

Es ließ sich eine gute Reaktion auf die Glukosestimulation zeigen. Die Kontrollen bei 0mM Glukose blieben sämtlich in einem engen, niedrigen Bereich. Überraschend war, dass sowohl ein Knockdown von STIM als auch eine Überexpression von STIM und Orai zu einer verringerten Insulinproduktion bei Stimulation mit 16mM Glukose über eine halbe Stunde führten. Die unbehandelte Kontrolle lieferte einen leicht höheren Wert als die mit Überexpression und Knockdown behandelten Kontrollen, was für Zellschäden durch die jeweiligen Prozeduren spricht, allerdings ist der Unterschied nicht signifikant und $n=1$.

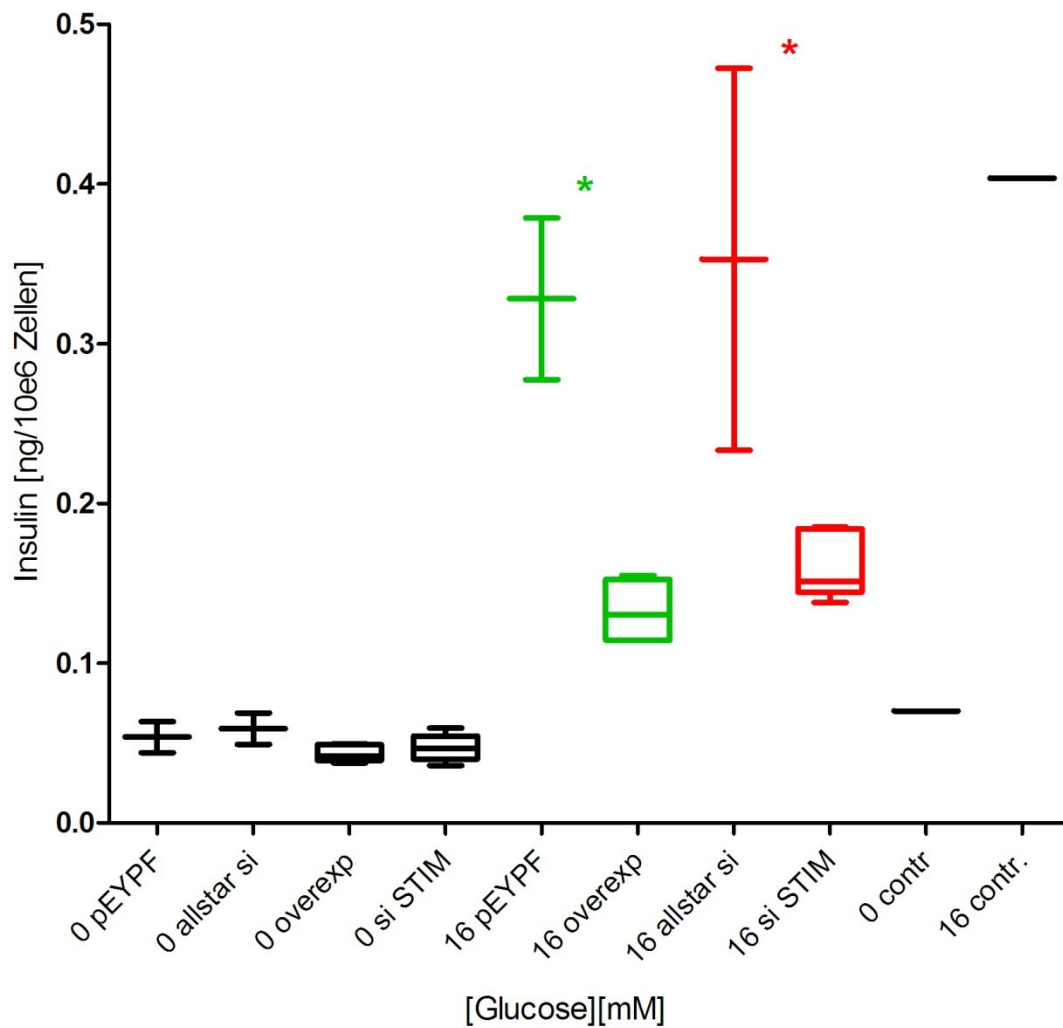


Abbildung 31: STIM1 & Orai1 Überexpression sowie STIM1 Knockdown verringern die GDIS. In glukosefreiem Medium zeigen die Zellen unabhängig von STIM1 und Orai1 Expressionslevel praktisch keine Insulinfreisetzung.

In einem Folgeexperiment ließ sich der supprimierende Effekt von STIM Knockdown bei Glukosestimulation im Vergleich zur Kontroll-siRNA signifikant reproduzieren (Abbildung 32).

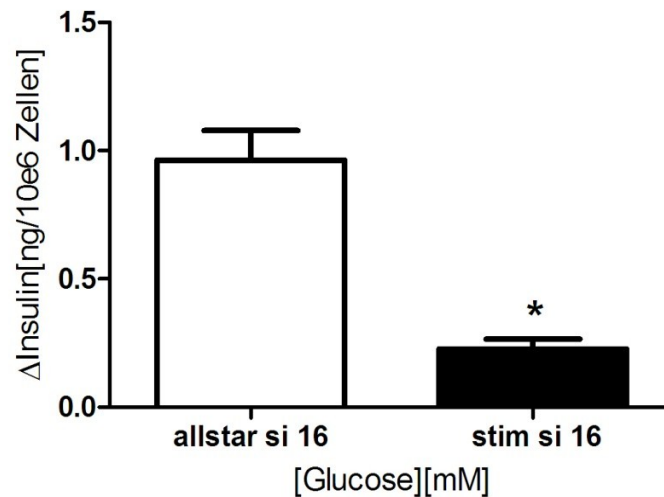


Abbildung 32: Die Transfektion mit rat STIM1 siRNA senkt die Insulinsekretion im Vergleich zur Kontrolle signifikant. (n=6, p=0,0001)

Bei alleiniger Überexpression von STIM1 ohne Orail zeigte sich keine signifikante Reduktion der Insulinproduktion im Vergleich zu nur mit TransFast™ behandelten Zellen (Abbildung 33).

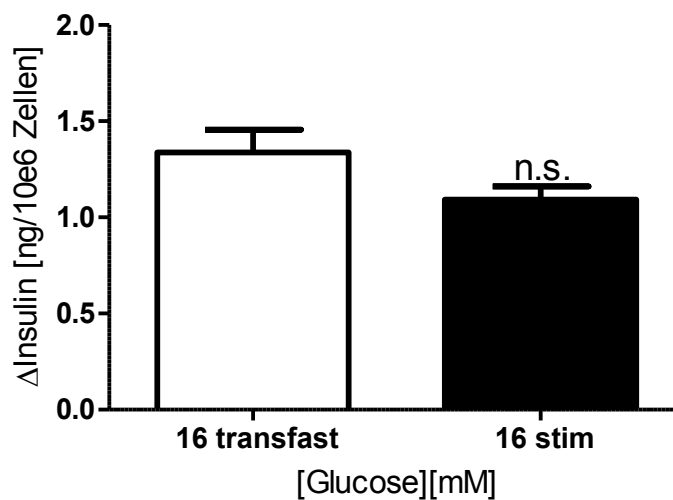


Abbildung 33: Bei STIM Überexpression ist die Insulinproduktion nicht signifikant reduziert. (n=6, p=0,1028)

4 Zusammenfassende Diskussion

4.1 Glukose bedingt mitochondrialen [ATP]-Anstieg

Die Beobachtungen aus 3.1.1 passen sehr gut in das bekannte Modell der Insulinausschüttung in β -Zellen. Demnach verhält sich das Glukoseangebot proportional zur Erzeugung energiereicher Phosphate (v.a. ATP). Deren Erzeugung geschieht über die Atmungskette und oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien, wo auch zuerst ein Anstieg der $[ATP]_{\text{mito}}$ erkennbar sein sollte. Dessen Transport ins Zytoplasma und der damit verbundene Anstieg der $[ATP]_{\text{zyto}}$ sollte mit gewisser Verzögerung beobachtet werden können.

Die INS-1 Zellreihe lässt sich durch Klonieren in mehrere Linien aufspalten. Jeder der Klone weist spezifische Eigenschaften, insbesondere im Bereich der GDIS auf, wobei der Klon 832/13 hervorstach [67]. Da bei unseren Versuchen mit den polyklonalen INS-1 Zellen gearbeitet wurde besteht die Möglichkeit, dass auch die Reaktivität der Zellen spezifisch für eine Zelllinie ist. Daher sollte die Möglichkeit, die Messung der $[ATP]_{\text{mito}}$ als Alternative zur Insulinbestimmung bei der Charakterisierung der INS-1 Zelllinien zu nutzen, erwogen werden.

4.2 Der Anstieg der mitochondrialen ATP Konzentration geschieht schneller als ihr Abfall

Der Anstieg der $[ATP]_{\text{mito}}$ wird durch die bekannten Glukose metabolisierenden Mechanismen (GLUT2, Glukokinase, Glykolyse, Atmungskette) realisiert; ihr Abfall durch diverse ATP konsumierende Prozesse, die insbesondere durch die Insulinsekretion bedingt sind. Hierzu zählen: Exozytose, Vesikeltransport und Resynthese des Insulins wobei diese Prozesse eher langfristig ATP verbrauchen und zu diesem kurzfristigen Abfall wenig beitragen werden. Allerdings induzieren Erregung und Depolarisation der Zelle kurzfristige Ausgleichsmechanismen wie die plasmalemmale Na^+/K^+ -ATPase, den NCX oder SERCA, welche die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ normalisieren. Für zukünftige Experimente wäre es interessant, ob sich über Hemmung dieser Prozesse (etwa SERCA über Thapsigargin etc.) der Abfall der $[ATP]_{\text{mito}}$ verzögern ließe.

4.3 Mechanische Reizung führt zu gesteigerter ATP-Produktion

Gesteigerter Fluss des Mediums und der damit verbundene Scherstress für die Zellen führte zu einer Erhöhung der $[ATP]_{\text{mito}}$ (siehe 3.1.3). Daraus könnte auch eine gesteigerte Insulinausschüttung resultieren. Die Registrierung von Scherstress geschieht u.a. über das Zytoskelett [79,80]. Möglicherweise sind darin die gleichen Mechanismen involviert, die auch bei der Modulation der GDIS eine Rolle spielen.

4.4 Zusatz von HBSS-Medium führt zum Anhaften der INS-1 Zellen am Wellboden

Wie in Abbildung 16 gezeigt, ändern die INS-1 Zellen ihre Morphologie nachdem das Kulturmedium durch HBSS ohne Glukose ersetzt wurde. Die anfangs kugeligen Zellen sind dann abgeflacht und haben eine größere Kontaktfläche zum Wellboden. Offenbar führt die durch den Glukosemangel hervorgerufene Umstellung des Metabolismus zu weiteren Veränderungen im Verhalten der Zellen. In diesem Fall könnten Veränderungen an den Adhäsionsmolekülen eine Rolle spielen.

4.5 Mitochondrienfragmentierung durch Glukose

In 3.1.5 zeigte sich, dass in Bedingungen mit Glukosestimulation die Mitochondrien fragmentiert vorlagen und durch Entzug der Glukose elongierte, fadenförmige Strukturen entstanden. Ca^{2+} Einstrom ist als Auslöser der Fragmentierung von Mitochondrien beschrieben worden [78]. Dabei sollen die Effekte auf die Mitochondrienmorphologie über die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Protein Kinase I α (CaMKI α), die das *dynamin-related protein 1* (Drp1) phosphoryliert, vermittelt werden [81]. Diese Beobachtung bestätigt die Theorie der GDIS, wonach ein Ca^{2+} Einstrom durch Glukosestimulation erfolgt. Eben dieser Ca^{2+} Einstrom kann über oben genannte Mechanismen zu den Beobachtungen in Abbildung 18a, (nämlich Fragmentierung der Mitochondrien, Ausbildung von kleinen sphärischen Partikeln und Loops) geführt haben. Die folgende Behandlung mit glukosefreiem Puffer beendet demnach den Ca^{2+} Einstrom und die Mitochondrien nehmen ihre gestreckte, fadenförmige Struktur wieder an.

Außerdem ist die Phosphorylierung von Drp1 durch die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA) beschrieben [82]. Dies geschieht durch CaMKI α und PKA an der gleichen Position (Serin 600). Diese Beobachtung ist deshalb interessant, da der Signalweg der cAMP Produktion kraft Aktivierung der AC auch eine wichtige Rolle bei der Modulation der

Insulinausschüttung spielt (vgl. 1.1.2.2 Insulinausschüttung, Abbildung 4, Abbildung 5 und Tabelle 3).

Eine weitere Studie zeigt, dass es unter stark erhöhten [Glukose] in nicht erregbaren Endothelzellen auch zu Fragmentierung und einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_{\text{zyto}}$ kommt. Dieses Phänomen scheint jedoch über die Produktion von *reactive oxygen species* (ROS) vermittelt zu werden [83]. Es stellt einen weiteren Signalweg dar, der auch in β -Zellen Einfluss auf Ca^{2+} -Einstrom und damit die Insulinsekretion haben mag.

4.6 *INS-1* Zellen verhalten sich entsprechend dem Modell der glukoseabhängigen Insulinsekretion

Etliche Ergebnisse stimmen gut mit dem Modell der GDIS überein. Es konnte die GDIS gezeigt werden und eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der $[Glukose]_e$ und der ausgeschütteten Insulinmenge erstellt werden (vgl. 3.1.9). Außerdem nimmt die Insulinsekretion über die Zeit zu (vgl. 3.1.10).

4.7 Normalisierung

Sämtliche genannte Normalisierungsverfahren eignen sich nur bedingt, da die von ihnen produzierten Fehler meist größer sind als die kompensierte Abweichung in der Zelldichte. Diese Fehler sind im Wesentlichen methodisch bedingt. Der MTT-Assay zeigt zusätzlich eine Abhängigkeit von der [Glukose], was seine Variabilität noch steigert. Als optimale Normierungsmethode stellte sich schließlich die globale Zellanzahl heraus. Dabei werden alle Ergebnisse der Insulinmessung um den gleichen Faktor verändert ihre Proportionalität bleibt erhalten und die Streuung wird nicht vergrößert. Dies ist dann zulässig, wenn die Zellanzahl in den Wells kaum variiert.

Um das optimale Normalisierungsverfahren herauszufinden wäre es nötig, sie auf quasi standardisierte Zellen anzuwenden und anschließend die Streuung zu vergleichen. Da die Erzeugung solcher Zelldichten jedoch nur bis zu einem gewissen Grad möglich ist, wird ein direkter Vergleich der Methoden schwierig.

4.8 Veränderung in der STIM Expression verringert GDIS

Sowohl die Überexpression als auch der Knockdown von STIM1 führte zu einer verringerten GDIS. Der Effekt bei reduziertem STIM war erwartet. Wenn der SOCE zur Vesikelfreisetzung beiträgt und er durch fehlendes STIM unterdrückt wird, kann weniger Ca^{2+} -Einstrom stattfinden und die GDIS fällt schwächer aus.

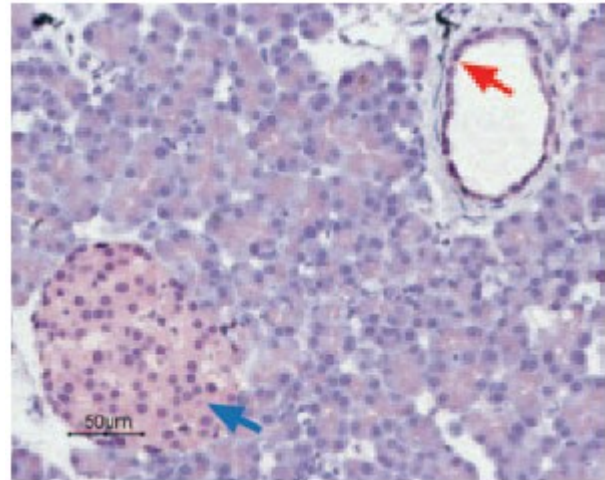


Abbildung 34: Immunhistochemie mit Anti- $\text{Ca}_v1.2$ Antikörper im Ratten-Pankreas. Endokrine (blau) und exokrine Anteile (rot) sind positiv [83].

Der supprimierende Effekt bei Überexpression von STIM1 und Orai1 war überraschend und widersprach der

oben angesprochenen Arbeitshypothese (1.3). Eine alternative Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass STIM auch mit den spannungsabhängigen L-Typ $\text{Ca}_v1.2$ -Kanälen interagiert und diese dabei hemmt [64]. Diese Kanäle kommen auch in β -Zellen vor [84] (siehe Abbildung 34). Durch die Hemmung der Ca^{2+} -Kanäle wird der Einstrom infolge der Depolarisation und damit die GDIS verringert. Dagegen spricht wiederum, dass sich mit alleiniger Überexpression von STIM keine signifikante Reduktion der GDIS im Vergleich zur Kontrolle zeigen ließ.

Andere Studien zur Untersuchung des CICR in β -Zellen kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen ob und wie ausgeprägt dieser vorhanden ist [35,63,85]. Die hier vorgelegten Ergebnisse fügen sich aufgrund der Hemmung der GDIS bei STIM/Orai-Überexpression auch nicht nahtlos in die bestehende Hypothese ein. Sie weisen jedoch auf eine noch genauer zu bestimmende regulatorische Funktion auf die GDIS hin. Freilich sind die Ergebnisse mit geringer Stichprobenzahl durchgeführt und meist nicht reproduziert worden. Für fundierte Aussagen sind zweifellos weitere Versuche erforderlich.

4.9 Therapeutische Ansätze

Aufgrund der hohen und steigenden Prävalenz von Diabetes mellitus Typ 2 besteht großes Interesse an besseren therapeutischen Maßnahmen und einem detaillierteren Verständnis der Erkrankung. Der Einfluss von STIM und Orai auf die GDIS wird ein weiteres Puzzlestück auf dem Weg zur Aufklärung des Glukosestoffwechsels sein. Er bietet auch

Ansatzpunkte für neue Therapiestrategien. So könnte man über eine medikamentöse Aggregation von Orai mit extrazellulären Wirkstoffen über den Ca^{2+} -Einstrom die Insulinsekretion fördern oder man blockiert die Bindung von STIM an die $\text{Ca}^{2+}_v1.2$ – Kanäle und hebt so ihre hemmende Wirkung auf. Viele Ansätze sind denkbar, doch wird bei dieser Erkrankung trotz aller pharmakologischen Fortschritte wahrscheinlich ein gesunder Lebensstil mit ausreichend körperlicher Aktivität stets die beste Maßnahme sein [86]. Allerdings kann man durch ein besseres Verständnis der Physiologie und demzufolge der Pathogenese dieser Erkrankung möglicherweise noch bessere Methoden für die Prävention entwickeln.

5 Referenz

1. Klimont J, Kyrtil J, Leitner B: Klimont J, Kytir J, Leitner B (Ed):Österreichische Gesundheitsbefragung 2006/2007. Wien: 2007.
2. Alberti KG, Zimmet PZ: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet.Med. 1998, 15(7):539-553.
3. Meisinger C, Strassburger K, Heier M, Thorand B, Baumeister SE, Giani G, Rathmann W: Prevalence of undiagnosed diabetes and impaired glucose regulation in 35-59-year-old individuals in Southern Germany: the KORA F4 Study. Diabet.Med. 2010, 27(3):360-362.
4. Hauner H: The costs of diabetes mellitus and its complications in Germany. Dtsch.Med.Wochenschr. 2006, 131 Suppl 8:S240-S242.
5. Biesalski H, Bischoff S, Puchstein C: Ernährungsmedizin. Stuttgart: Georg Thieme; 2010.
6. Siegenthaler W, Blum H: Siegenthaler W, Amann-Vesti BR (Ed):Klinische Pathophysiologie. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2006.
7. DeFronzo RA: DeFronzo RA, Ferrannini E (Ed):International textbook of diabetes mellitus. Chichester ; Hoboken, NJ: Wiley; 2004.
8. Neel JV: Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? Am.J.Hum.Genet. 1962, 14:353-362.
9. Eaton SB, Konner M: Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. N.Engl.J.Med. 1985, 312(5):283-289.
10. Welsch U: Lehrbuch Histologie. München ; Jena: Urban und Fischer; 2003.
11. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (Ed):Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München: Elsevier; 2009.
12. Löffler G, Petrides P, Heinrich P: Biochemie & Pathobiochemie. Heidelberg: Springer; 2007.
13. Sturgess NC, Ashford ML, Carrington CA, Hales CN: Single channel recordings of potassium currents in an insulin-secreting cell line. J.Endocrinol. 1986, 109(2):201-207.

14. Aguilar-Bryan L, Bryan J: Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr.Rev.* 1999, 20(2):101-135.
15. Clement JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J: Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* 1997, 18(5):827-838.
16. Doyle ME, Egan JM: Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol.Rev.* 2003, 55(1):105-131.
17. Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY: A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 1999, 22(3):537-548.
18. Horn F: Horn F (Ed):*Biochemie des Menschen*. Stuttgart [u.a.]: 2009.
19. Ashcroft FM, Kelly RP, Smith PA: Two types of Ca channel in rat pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch.* 1990, 415(4):504-506.
20. Rutter GA, Hill EV: Insulin vesicle release: walk, kiss, pause ... then run. *Physiology (Bethesda)* 2006, 21:189-196.
21. Wickner W, Schekman R: Membrane fusion. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 2008, 15(7):658-664.
22. Tsuboi T, McMahon HT, Rutter GA: Mechanisms of dense core vesicle recapture following "kiss and run" ("cavicapture") exocytosis in insulin-secreting cells. *J.Biol.Chem.* 2004, 279(45):47115-47124.
23. Scheenen WJ, Wollheim CB, Pozzan T, Fasolato C: Ca²⁺ depletion from granules inhibits exocytosis. A study with insulin-secreting cells. *J.Biol.Chem.* 1998, 273(30):19002-19008.
24. Chow RH, Klingauf J, Neher E: Time course of Ca²⁺ concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994, 91(26):12765-12769.
25. Seghers V, Nakazaki M, DeMayo F, Aguilar-Bryan L, Bryan J: Sur1 knockout mice. A model for K(ATP) channel-independent regulation of insulin secretion. *J.Biol.Chem.* 2000, 275(13):9270-9277.
26. Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J, Seino S: Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998, 95(18):10402-10406.
27. Malmgren S, Nicholls DG, Taneera J, Bacos K, Koeck T, Tamaddon A, Wibom R, Groop L, Ling C, Mulder H, Sharoyko VV: Tight coupling between glucose and mitochondrial metabolism in clonal beta-cells is required for robust insulin secretion. *J.Biol.Chem.* 2009, 284(47):32395-32404.

28. Eto K, Tsubamoto Y, Terauchi Y, Sugiyama T, Kishimoto T, Takahashi N, Yamauchi N, Kubota N, Murayama S, Aizawa T, Akanuma Y, Aizawa S, Kasai H, Yazaki Y, Kadowaki T: Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 1999, 283(5404):981-985.
29. Jitrapakdee S, Wutthisathapornchai A, Wallace JC, MacDonald MJ: Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* 2010, 53(6):1019-1032.
30. Xu J, Han J, Long YS, Epstein PN, Liu YQ: The role of pyruvate carboxylase in insulin secretion and proliferation in rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2008, 51(11):2022-2030.
31. MacMullen C, Fang J, Hsu BY, Kelly A, de Lonlay-Debeney P, Saudubray JM, Ganguly A, Smith TJ, Stanley CA, Hyperinsulinism/hyperammonemia Contributing Investigators: Hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome in children with regulatory mutations in the inhibitory guanosine triphosphate-binding domain of glutamate dehydrogenase. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 2001, 86(4):1782-1787.
32. Malli R, Graier WF: Mitochondrial Ca²⁺ channels: Great unknowns with important functions. *FEBS Lett.* 2010, 584(10):1942-1947.
33. Kennedy ED, Rizzuto R, Theler JM, Pralong WF, Bastianutto C, Pozzan T, Wollheim CB: Glucose-stimulated insulin secretion correlates with changes in mitochondrial and cytosolic Ca²⁺ in aequorin-expressing INS-1 cells. *J.Clin.Invest.* 1996, 98(11):2524-2538.
34. Rutter GA, Theler JM, Murgia M, Wollheim CB, Pozzan T, Rizzuto R: Stimulated Ca²⁺ influx raises mitochondrial free Ca²⁺ to supramicromolar levels in a pancreatic beta-cell line. Possible role in glucose and agonist-induced insulin secretion. *J.Biol.Chem.* 1993, 268(30):22385-22390.
35. Rutter GA, Tsuboi T, Ravier MA: Ca²⁺ microdomains and the control of insulin secretion. *Cell Calcium* 2006, 40(5-6):539-551.
36. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Ed): *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer Medizin; 2007.
37. Lüllmann H, Mohr K, Hein L: Lüllmann H, Mohr K, Wehling M (Ed): *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006.
38. Konturek SJ, Konturek JW: Cephalic phase of pancreatic secretion. *Appetite* 2000, 34(2).
39. Neshler R, Cerasi E: Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose. *Diabetes* 2002, 51 Suppl 1:S53-S59.

40. Caumo A, Luzi L: First-phase insulin secretion: does it exist in real life? Considerations on shape and function. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 2004, 287(3):E371-E385.
41. Koerker DJ, Goodner CJ, Hansen BW, Brown AC, Rubenstein AH: Synchronous, sustained oscillation of C-peptide and insulin in the plasma of fasting monkeys. *Endocrinology* 1978, 102(5):1649-1652.
42. Meissner HP: Electrophysiological evidence for coupling between beta cells of pancreatic islets. *Nature* 1976, 262(5568):502-504.
43. Porksen N, Hollingdal M, Juhl C, Butler P, Veldhuis JD, Schmitz O: Pulsatile insulin secretion: detection, regulation, and role in diabetes. *Diabetes* 2002, 51 Suppl 1:S245-S254.
44. Saltiel AR, Kahn CR: Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001, 414(6865):799-806.
45. Krauss G: *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Weinheim: Wiley-VCH; 2008.
46. Barsh GS, Schwartz MW: Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat.Rev.Genet.* 2002, 3(8):589-600.
47. Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford ML: Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat.Neurosci.* 2000, 3(8):757-758.
48. Peters A, Schweiger U, Pellerin L, Hubold C, Oltmanns KM, Conrad M, Schultes B, Born J, Fehm HL: The selfish brain: competition for energy resources. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 2004, 28(2):143-180.
49. Boura-Halfon S, Zick Y: Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 2009, 296(4):E581-E591.
50. Knot HJ, Laher I, Sobie EA, Guatimosim S, Gomez-Viquez L, Hartmann H, Song LS, Lederer WJ, Graier WF, Malli R, Frieden M, Petersen OH: Twenty Years of Calcium Imaging: Cell Physiology to Dye For. *Molecular Interventions* 2005, 5(2):112-127.
51. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2003, 4(7):517-529.
52. Deng X, Wang Y, Zhou Y, Soboloff J, Gill DL: STIM and Orai: dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals. *J Biol Chem* 2009, 284(34):22501-22505.

-
53. Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS: Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J.Cell Biol.* 2006, 174(6):803-813.
 54. Grigoriev I, Gouveia SM, van der Vaart B, Demmers J, Smyth JT, Honnappa S, Splinter D, Steinmetz MO, Putney JW, Hoogenraad CC, Akhmanova A: STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr.Biol.* 2008, 18(3):177-182.
 55. Varnai P, Hunyady L, Balla T: STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci* 2009, 30(3):118-128.
 56. Putney JW: Recent breakthroughs in the molecular mechanism of capacitative calcium entry (with thoughts on how we got here). *Cell Calcium* 2007, 42(2):103-110.
 57. Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet JP: CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* 2006, 312(5777):1220-1223.
 58. Gwack Y, Srikanth S, Feske S, Cruz-Guilloty F, Oh-hora M, Neems DS, Hogan PG, Rao A: Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J.Biol.Chem.* 2007, 282(22):16232-16243.
 59. Parekh AB, Putney JW: Store-operated calcium channels. *Physiol.Rev.* 2005, 85(2):757-810.
 60. Williams RT, Manji SS, Parker NJ, Hancock MS, Van Stekelenburg L, Eid JP, Senior PV, Kazenwadel JS, Shandala T, Saint R, Smith PJ, Dziadek MA: Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem.J.* 2001, 357(Pt 3):673-685.
 61. Frischauf I, Schindl R, Derler I, Bergsmann J, Fahrner M, Romanin C: The STIM/Orai coupling machinery. *Channels (Austin)* 2008, 2(4):261-268.
 62. Tamarina NA, Kuznetsov A, Philipson LH: Reversible translocation of EYFP-tagged STIM1 is coupled to calcium influx in insulin secreting beta-cells. *Cell Calcium* 2008, 44(6):533-544.
 63. Graves TK, Hinkle PM: Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in the pancreatic beta-cell: direct evidence of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release. *Endocrinology* 2003, 144(8):3565-3574.
 64. Gill D, Wang Y, Deng X, Mancarella S, Hendron E, Eguchi S, Soboloff J, Tang X: STIM Proteins - Coupling to Orai and L-Type Channels. *FASEB Summer Research Conferences "Calcium & Cell Function"* Steamboat Springs, Colorado 2010.

-
65. Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB: Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 1992, 130(1):167-178.
66. Skelin M, Rupnik M, Cencic A: Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *ALTEX* 2010, 27(2):105-113.
67. Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB: Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 2000, 49(3):424-430.
68. TransFast Transfection Reagent
[http://www.promega.com/catalog/catalogproducts.aspx?categoryname=productleaf_912&ckt=1]
69. Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL: Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J.Biol.Chem.* 1994, 269(4):2550-2561.
70. Muik M, Frischauf I, Derler I, Fahrner M, Bergsmann J, Eder P, Schindl R, Hesch C, Polzinger B, Fritsch R, Kahr H, Madl J, Gruber H, Groschner K, Romanin C: Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *J.Biol.Chem.* 2008, 283(12):8014-8022.
71. Tomari Y, Zamore PD: Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* 2005, 19(5):517-529.
72. Presley AD, Fuller KM, Arriaga EA: MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J.Chromatogr.B.Analyt Technol.Biomed.Life.Sci.* 2003, 793(1):141-150.
73. Imamura H, Nhat KP, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H: Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2009, 106(37):15651-15656.
74. Wang Y, Wang N: FRET and mechanobiology. *Integr Biol (Camb)* 2009, 1(10):565-573.
75. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72:248-254.
76. Compton SJ, Jones CG: Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal.Biochem.* 1985, 151(2):369-374.

77. Berridge MV, Tan AS: Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch.Biochem.Biophys.* 1993, 303(2):474-482.
78. Graier WF, Frieden M, Malli R: Mitochondria and Ca(2+) signaling: old guests, new functions. *Pflugers Arch* 2007, 455(3):375-396.
79. Dahl KN, Kalinowski A, Pekkan K: Mechanobiology and the microcirculation: cellular, nuclear and fluid mechanics. *Microcirculation* 2010, 17(3):179-191.
80. Papadaki M, Eskin SG: Effects of fluid shear stress on gene regulation of vascular cells. *Biotechnol.Prog.* 1997, 13(3):209-221.
81. Han XJ, Lu YF, Li SA, Kaitsuka T, Sato Y, Tomizawa K, Nairn AC, Takei K, Matsui H, Matsushita M: CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J.Cell Biol.* 2008, 182(3):573-585.
82. Cribbs JT, Strack S: Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* 2007, 8(10):939-944.
83. Paltauf-Doburzynska J, Malli R, Graier WF: Hyperglycemic conditions affect shape and Ca2+ homeostasis of mitochondria in endothelial cells. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2004, 44(4).
84. Cherki R, Luques L, Anis Y, Meir A: Ion Channels in Endocrine Pancreatic Cells and their Role in Diabetes. *Modulator* 2006, No.21:16-21.
85. Varadi A, Rutter GA: Ca2+-induced Ca2+ release in pancreatic islet beta-cells: critical evaluation of the use of endoplasmic reticulum-targeted "cameleons". *Endocrinology* 2004, 145(10):4540-4549.
86. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M, Finnish Diabetes Prevention Study Group: Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N.Engl.J.Med.* 2001, 344(18).