

Pharmakologie und Toxikologie

**Regulation der mRNA von
G-Protein- α -Untereinheiten als Mechanismus
der heterologen Desensitivierung der
Insulinsekretion**

Stefanie Kesper

-1997-

Pharmakologie und Toxikologie

**Regulation der mRNA von
G-Protein- α -Untereinheiten als Mechanismus
der heterologen Desensitivierung der
Insulinsekretion**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Stefanie Kesper
aus Dortmund

-1997-

Dekan: Prof. Dr. F.-K. Holtmeier

Erster Gutachter: Prof. Dr. E. J. Verspohl

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H. Glasl

Tage der mündlichen Prüfungen: 5. Mai, 12. Mai, 13. Mai 1997

Tag der Promotion: 13. Mai 1997

Meinen Eltern
und Ralph

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	1
1.1 G-Proteine.....	1
1.1.1 Struktur.....	2
1.1.2 Funktionsweise.....	3
1.1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren	6
1.1.4 Effektoren	8
1.1.4.1 Adenylylcyclase.....	9
1.1.4.2 Phospholipasen	10
1.1.4.3 Ionenkanäle.....	11
1.2 Insulinsekretion	12
1.2.1 Glucose-induzierte Insulinsekretion.....	12
1.2.2 Mediatoren der Insulinsekretion.....	14
1.2.2.1 Calcium	14
1.2.2.2 Phospholipase C-System	14
1.2.2.3 Phospholipase A ₂ -System.....	15
1.2.2.4 Adenylylcyclase-System	16
1.2.3 Stimulatoren der Insulinsekretion.....	17
1.2.3.1 GIP.....	18
1.2.3.2 GLP-1.....	19
1.2.4 Inhibitoren der Insulinsekretion.....	22
1.2.4.1 α_2 -Adrenozeptoragonisten	22
1.2.4.2 Lithium	24
1.2.4.3 Galanin	26
1.3 Regulation der Genexpression	28

1.3.1 cAMP abhängige Genregulation.....	30
1.4 Zielsetzung	32
2 Material	33
2.1 Zelllinie INS-1	33
2.2 Bakterienstamm und Plasmidvektoren.....	33
2.3 Geräte	34
2.4 Chemikalien, Kits und Enzyme.....	34
2.5 Lösungen.....	35
2.5.1 Lösungen für die Transformation von E. coli.....	35
2.5.2 Lösungen für die Anzucht der E. coli	36
2.5.3 Lösungen für die Plasmidisolierung	36
2.5.4 Lösungen für die Gewinnung spezifischer DNA-Fragmente.....	37
2.5.5 Lösungen für die DNA-Markierung	37
2.5.6 Lösungen für die RNA-Isolierung	38
2.5.7 Lösungen für Gelelektrophorese und Northern Blot	38
2.5.8 Lösungen für die Hybridisierung	39
2.5.9 Lösungen für die Detektion.....	40
2.5.10 Lösungen für die reverse Transkription	40
2.5.11 Lösungen für die PCR.....	41
2.5.12 Lösungen für die Southern Technik.....	41
2.5.13 Lösungen für Insulinsekretionsversuche	41
2.5.14 Stammlösungen für die Inkubationen.....	42
3 Methoden.....	43
3.1 Herstellung selektiver Sonden.....	43

3.1.1 Transformation von E. coli	43
3.1.2 Aufzucht der E. coli.....	44
3.1.3 Isolierung der Plasmide.....	45
3.1.4 Gewinnung spezifischer DNA-Fragmente.....	46
3.1.5 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA durch random-priming.....	48
3.1.6 Ermittlung der Einbaurate markierter Uridinphosphate.....	50
3.2 Northern Technik	50
3.2.1 RNA-Isolierung	50
3.2.2 Gelelektrophorese.....	51
3.2.3 Northern Blot	52
3.2.4 Hybridisierung	53
3.2.5 Chemilumineszenzdetektion	54
3.2.6 Laserdensitometrie.....	56
3.3 PCR	56
3.3.1 Reverse Transkription.....	58
3.3.2 PCR der α_{i1} - und α_o -cDNA	58
3.3.3 Identifizierung der amplifizierten Fragmente.....	59
3.3.3.1 Bestimmung der Größe	60
3.3.3.2 Southern Technik.....	60
3.4 Inkubationsbedingungen der Versuche zur Beeinflussung des mRNA-Gehaltes	61
3.5 Versuche zur Insulinsekretion	62
3.6 Statistik.....	64
4 Ergebnisse.....	65
4.1 Vorkommen von G-Protein- α -Untereinheiten in INS-1 Zellen	65

4.2 Regulation der α_S - und α_{i2} -mRNA.....	67
4.2.1 Regulation durch Adrenozeptoragonisten.....	68
4.2.2 Regulation durch Modulatoren der Insulinsekretion	71
4.2.3 Einfluß von Verapamil auf die Regulation der mRNA	75
4.3 Einfluß einer Vorinkubation auf die Insulinsekretion	77
5 Diskussion.....	84
5.1 Vorkommen von G-Proteinen in insulinsezernierenden Zellen	84
5.2 Regulation der α_S - und α_{i2} -mRNA.....	86
5.2.1 Identifizierung des für die Regulation verantwortlichen Adrenozeptors.....	86
5.2.2 Einfluß der Zeit auf den mRNA-Gehalt	87
5.2.3 Effekte von Galanin und Lithium.....	91
5.2.4 cAMP und die Regulation der α_{i2} -mRNA.....	92
5.2.5 Mechanismus der α_S -mRNA Regulation.....	94
5.2.6 Ca^{2+} -abhängige Regulation der mRNA	95
5.3 Modulation der Insulinsekretion.....	97
5.3.1 Heterologe Desensitivierung der Insulinsekretion	97
5.3.2 Einfluß auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion	101
6 Zusammenfassung	107
6.1 Ergebnisse	107
6.2 Schlußfolgerungen.....	108
7 Literatur	109
8 Anhang	140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	Adenylylcyclase
ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMV	<i>avian myoblastosis-Virus</i> (ein Vogel-Myeloblastosevirus)
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	<i>base pair</i> (Basenpaare)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
cDNA	<i>copy DNA</i> (zur RNA komplementäre, einzelsträngige DNA)
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
CREB	<i>CRE binding protein</i>
cRNA	<i>complementary RNA</i> (komplementäre RNA)
CSPD®	Dinatrium 3-(4-methoxy Spiro{1,2dioxetan-3,2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1.1.3,7]decan}-4-yl) phenyl-phosphat
DAG	1,2-Diacylglycerol
DIG	Digoxigenin
DMDC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>electro mobility shift assay</i>
Fab	antigenbindendes Fragment
G-Protein	guaninnucleotidbindendes Protein
GIP	<i>gastric inhibitory polypeptide</i> , bzw. <i>glucose-dependent insulinotropic peptide</i>
GLP-1/GLP-2	<i>glucagon-like peptide-1/glucagon-like peptide-2</i>
GLUT	Glucosetransporter
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIT	Hamsterinsulinomazelllinien
IgG	Immunglobulin G
INS-1	Ratteninsulinomazelllinie
IP ₃	Inositol-(1,4,5)-trisphosphat

IRI	immunoreaktives Insulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KRH	Krebs-Ringer-HEPES
LB-Medium	komplexes Standardmedium nach Luria Bertani
MARCKS	<i>myristolated alanine-rich C kinase substrate</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
M-Rezeptor	muskarinischer Rezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
n	Anzahl (der Versuche)
NSB	<i>non-specific binding</i> (unspezifische Bindung)
NTP	Nucleotidtriphosphat
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered solution</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]-1,4-Piperazin-diethansulfonsäure
PKA	Proteinkinase A (cAMP-abhängige Proteinkinase)
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussistoxin
RE	Restriktionsendonuclease
RIA	<i>radioimmunoassay</i>
RIN	Ratteninsulinomazelllinien
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure)
RNase	RNA abbauendes Enzym
RT	reverse Transkription
S.E.(M.)	<i>standard error (of the mean)</i> (Standardabweichung (der Mittelwerte))
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	<i>sodium chloride, sodium citrate</i> (Natriumchlorid, Natriumcitrat)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	TRIS-EDTA
TC	<i>total counts</i> (gesamte Zerfallsrate)
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	<i>unit</i> (Einheit)
UK 14.304	5-Brom-6-(2-imidazolin-2-ylamino)-chinoxalin
UTP	Uridin-5'-triphosphat
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
vs.	<i>versus</i> (gegen)

1 EINLEITUNG

1.1 G-Proteine

Die Entdeckung der G-Proteine gelang durch die intensive Erforschung der Adenylylcyclase, eines Enzyms, das die Umsetzung von ATP (Adenosin-5'-triphosphat) zu cAMP (cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat) katalysiert. Damals stand die Frage nach dem Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Adenylylcyclase im Vordergrund. Rodbell et al. (1971) zeigten, daß ein Hormon die Adenylylcyclase nur aktivieren kann, wenn auch GTP vorhanden ist. Rekonstitutionsversuche an einer Zelllinie mit nicht funktionstüchtiger Adenylylcyclase machten deutlich, daß die Kopplung zwischen Rezeptor und Adenylylcyclase durch ein bisher unbekanntes Protein erfolgte (Ross und Gilman, 1977). Da dieses Protein GTP binden kann, prägten sie den Ausdruck GTP-bindendes Protein oder kurz: G-Protein. Gleichzeitig führte Pfeuffer (1977) eine teilweise Trennung von Adenylylcyclase und diesem aktivierenden Protein an einem mit Guaninnukleotiden substituierten Harz durch. Sternweis (1981) und Northup (1980) gelang die Aufreinigung, Isolierung und Charakterisierung des aufgrund seiner stimulatorischen Wirkung auf die Adenylylcyclase G_s genannten Proteins. Die Entdeckung, daß die Behandlung von Zellen mit Pertussistoxin die Hemmung der Adenylylcyclase durch Hormone verhindert (Katada und Ui, 1979), führte zur Charakterisierung des inhibitorischen G_i -Proteins (Bokoch et al., 1984; Katada et al., 1984).

Inzwischen sind weitere G-Proteine entdeckt worden und es wurde deutlich, welche wichtige Rolle sie bei der Übertragung eines Signals zwischen den Rezeptoren an der Zelloberfläche und den Effektorproteinen im Zellinneren spielen. Für ihre grundlegenden Untersuchungen, die zur Entdeckung der G-Proteine führten, erhielten A. G. Gilman und M. Rodbell 1994 den Nobelpreis für Medizin.

Zur großen Familie der GTP-bindenden Proteine gehören neben den oben beschriebenen Proteinen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, auch die sogenannten kleinen G-Proteine wie ras und ras-ähnliche Proteine und Elongations- und Initiationsfaktoren der Proteinsynthese (Übersicht bei Kaziro et al., 1991). Da diese Proteine sich in ihrer Struktur deutlich von einander unterscheiden, werden sie in verschiedene Subfamilien der Familie der GTP-bindenden Proteine eingeteilt. Als G-Proteine im engeren Sinne werden nur die heterotrimeren, an Rezeptoren koppelnden Proteine bezeichnet.

1.1.1 Struktur

G-Proteine sind Heterotrimere, die aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammengesetzt sind. Sie verhalten sich jedoch wie dissoziierbare Dimere, denn die α -Untereinheit kann sich von dem $\beta\gamma$ -Komplex trennen, der als Einheit zusammen bleibt. Die Bezeichnung α , β und γ erfolgte entsprechend der Proteingröße. Die α -Untereinheit hat eine Größe von 39-52 kDa, die β -Untereinheit von 35-36 kDa und die γ -Untereinheit von 7-10 kDa.

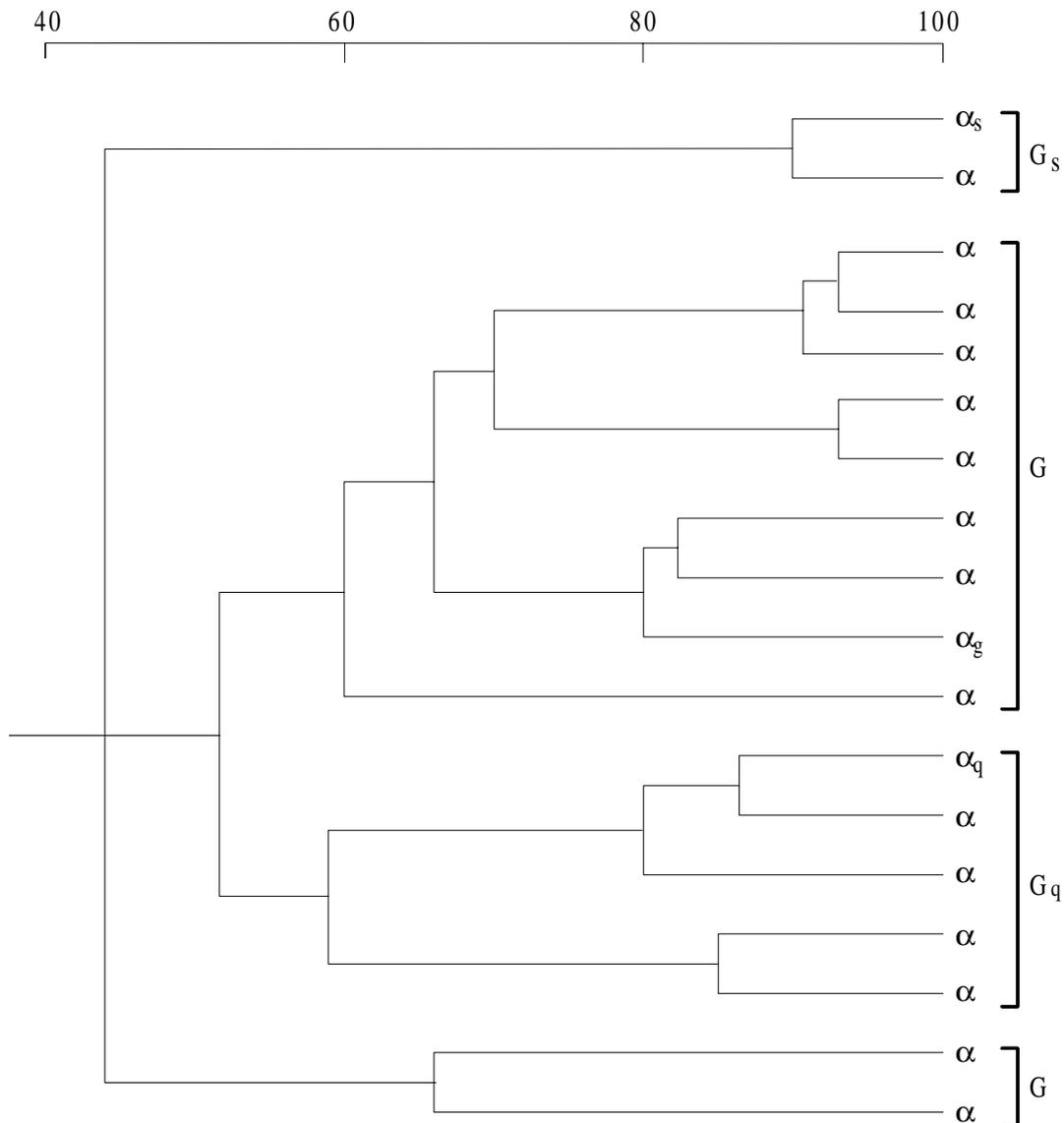


Abb. 1.1 Sequenzhomologie von G-Protein- α -Untereinheiten

Die Achse über der Abbildung gibt die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz (in %) an (nach Simon et al., 1991).

Die α -Untereinheiten werden aufgrund ihrer DNA-Sequenzhomologie in vier Familien eingeteilt: G_s , G_i , G_q und G_{12} (Abb. 1.1).

Die Mitglieder der G_s -Familie werden ubiquitär exprimiert und vermitteln die Stimulation der Adenylylcyclase. Zur G_i -Familie gehören die Pertussistoxin-sensitiven G-Proteine, u. a. G_{i1-3} und G_{o1-2} . Sie hemmen die Adenylylcyclase und regulieren die Aktivität von Ca^{2+} - und K^+ -Kanälen (Schultz et al., 1990). G_z ist Pertussistoxin-insensitiv und unterscheidet sich in seiner Struktur deutlich von den anderen Mitgliedern der G_i -Familie. Es wurde hauptsächlich in Nervenzellen und Blutplättchen gefunden. In Rekonstitutionsversuchen kann es durch verschiedene Rezeptoren aktiviert werden und hemmt die Adenylylcyclase (Offermanns und Schultz, 1994). G_q und G_{12} sind relativ neue Familien, deren Mitglieder zum Teil ubiquitär, zum Teil nur in spezifischen Geweben vorkommen. G_q -Proteine stimulieren die β -Isoform der Phospholipase C (Taylor et al., 1991; Lee et al., 1992). Die Mitglieder der G_{12} -Familie scheinen eine Rolle bei der Regulation des Zellwachstums zu spielen, aber der genaue Mechanismus ist noch unbekannt (Offermanns und Schultz, 1994). Bisher wurden einschließlich der Splicing-Varianten 23 G-Protein- α -Untereinheiten entdeckt, die von 17 Genen kodiert werden. Zu den ersten klonierten α -Untereinheiten gehören α_s , α_{i1-3} und α_o (Jones und Reed, 1987; Beals et al., 1987; Bray et al., 1987).

Durch Klonierung und Sequenzierung sind bis heute fünf β - und sieben γ -Untereinheiten identifiziert worden. Die β -Untereinheiten weisen untereinander hohe Homologie auf, während die γ -Untereinheiten heterogen aufgebaut sind (Fisher et al., 1992; Watson et al., 1994). Im Gegensatz zur α -Untereinheit besitzt der $\beta\gamma$ -Komplex hohe Lipophilie. Über die Prenylierung der γ -Untereinheit erfolgt die Verankerung in der Zellmembran (Simonds et al., 1991). Ursprünglich wurde vermutet, die α -Untereinheiten wären unspezifisch mit verschiedenen $\beta\gamma$ -Untereinheiten verbunden. Es hat sich aber herausgestellt, daß die Interaktion zwischen einzelnen β - und γ -Untereinheiten selektiv stattfindet (Pronin und Gautham, 1992) und daß nur eine bestimmte Kombination von α -, β - und γ -Untereinheit bevorzugt an einen Rezeptor koppelt (Kleuss et al., 1992; Schultz und Hescheler, 1993).

1.1.2 Funktionsweise

G-Proteine leiten hormonelle Signale ins Zellinnere weiter. Der erste Schritt einer Signalkaskade ist also die Aktivierung des G-Proteins nach Bindung eines Agonisten an den Rezeptor. Dies wird durch die Bindung verschiedener Guaninnukleotide ermöglicht. Die α -Untereinheit mit gebundenem GDP ist inaktiv und hat eine hohe Affinität zum

$\beta\gamma$ -Komplex. Durch die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor wird der Austausch von GDP gegen GTP katalysiert. Die damit einhergehende Konformationsänderung verursacht die Dissoziation der aktivierten α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit (Übersicht bei Gilman, 1987; Birnbaumer et al., 1990). Die freigesetzte α -Untereinheit interagiert nun mit dem Effektor, bis aufgrund der intrinsischen GTPase-Aktivität das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wird, die Untereinheiten wieder assoziieren und damit der Ausgangszustand wieder hergestellt ist. Die Geschwindigkeit, mit der nach Aktivierung des Rezeptors GDP gegen GTP ausgetauscht wird, ist bei den verschiedenen G-Proteinen unterschiedlich. G_i und G_o tauschen GDP schnell gegen GTP aus. G_s und die Proteine der G_q -Familie haben eine langsamere Austauschrate, und am langsamsten vollzieht sich der Austausch bei G_{12} und G_{13} (Fields et al. 1994; Laugwitz et al., 1994).

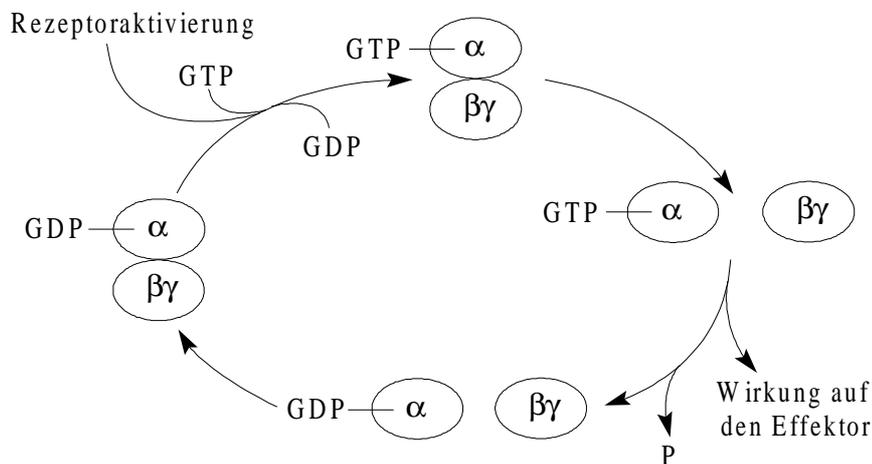


Abb. 1.2 Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus von G-Proteinen

Die Aktivierung des G-Proteins nach Stimulation des Rezeptors erfolgt durch den Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit. Durch die Hydrolyse des GTP gelangt die α -Untereinheit wieder in die inaktive GDP-gebundene Form.

Ursprünglich wurde angenommen, ausschließlich die aktivierten α -Untereinheiten seien an der Signaltransduktion beteiligt. Inzwischen wurden aber direkte Wechselwirkungen zwischen $\beta\gamma$ -Untereinheiten und verschiedenen Effektoren wie Adenylylcyclase, Phospholipase C und Ionenkanälen beobachtet (Übersicht bei Clapham und Neer, 1993; Gierschik und Camps, 1994).

Neben der oben beschriebenen Aktivierung des G-Proteins durch den Austausch von GDP gegen GTP werden zwei weitere Mechanismen diskutiert. Die erste Möglichkeit ist die direkte Phosphorylierung des GDP zu GTP, ohne daß das Guaninnukleotid ausgetauscht

wird. Vermittelt wird diese Phosphorylierung von einer Nukleotiddiphosphat-Kinase (NDP-Kinase), die eine Phosphatgruppe von ATP direkt auf das G-Protein-gebundene GDP überträgt (Kikkawa et al., 1990). Eine zweite Möglichkeit bezieht die β -Untereinheit mit ein. Die β -Untereinheit wird phosphoryliert und diese Phosphatgruppe wird dann auf das an die α -Untereinheit gebundene GDP übertragen, so daß eine aktivierte GTP-gebundene α -Untereinheit resultiert (Wieland et al., 1993; Kowluru et al., 1996).

Diesen Mechanismus, nach dem das an den Rezeptor gekoppelte G-Protein-Heterotrimer nach Aktivierung in α -Untereinheit und $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert, beschreibt die sogenannte Dissoziationstheorie von Gilman (1987). Untersuchungen der funktionellen Massen des Rezeptor-G-Protein-Komplexes (Schlegel et al., 1979) wiesen aber darauf hin, daß es sich um einen Multimeren-Komplex handelt, der sich erst nach Wechselwirkung mit dem Agonisten in die Monomere trennt. Rodbell (1992) bezeichnete dies als Disaggregationstheorie und führte weitere Untersuchungen dazu durch (Jahangeer und Rodbell, 1993).

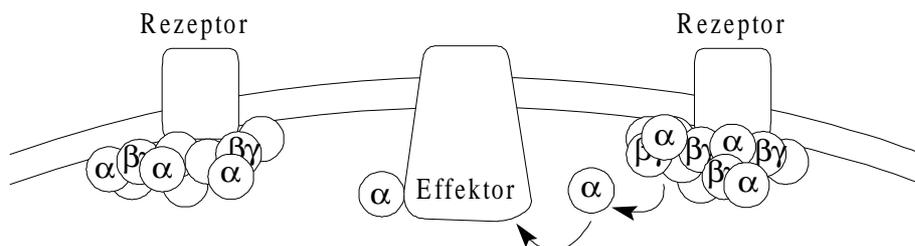


Abb. 1.3 *Mögliche Anordnung von Rezeptoren und G-Proteinen*

Alle Komponenten bleiben während des Prozesses mit der Zellmembran verbunden. Die G-Proteine liegen als Multimere am Rezeptor vor (modifiziert nach Neubig, 1994).

Auf diese Weise führt die Kopplung des Rezeptors an G-Protein-Multimere zu einer Amplifizierung des Signals, denn ein Rezeptormolekül kann viele G-Proteine innerhalb kurzer Zeit aktivieren. Zum Beispiel aktiviert ein einzelner Licht-aktivierter Rhodopsinrezeptor 3.000 G-Proteine pro Sekunde (Hargrave et al., 1993).

Die Vorstellung von G-Protein-Multimeren steht auch im Einklang mit Beobachtungen, die zeigen, daß bestimmten Rezeptoren nur eine begrenzte Menge von G-Proteinen zugänglich ist. Jede Zelle besitzt ein organisiertes Cytoskelett und die freie Beweglichkeit von Proteinen, besonders von membrangebundenen Proteinen, wird dadurch eingeschränkt. Nur so ist es zu verstehen, daß zum Beispiel trotz eines 30fachen Überschusses von G_{i2} , das an

α_2 -Adrenozeptoren koppeln kann, noch Rezeptoren nachgewiesen werden können, die nicht mit G_{i2} gekoppelt sind (Übersicht bei Neubig, 1994). Die Interaktionen zwischen Rezeptor und G-Protein sind also von der Organisation und Kompartimentierung der Zelle abhängig.

1.1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind nach dem gleichen Prinzip aufgebaut (Abb. 1.4). Sie bestehen aus einer Aminosäurekette, deren sieben hydrophobe Bereiche die Membran durchspannen, wobei das C-terminale Ende intrazellulär und das N-terminale Ende extrazellulär lokalisiert ist. Durch diese Anordnung existieren drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen, die zusammen mit dem N- bzw. C-Terminus die Bindung des Agonisten bzw. des G-Proteins vermitteln.

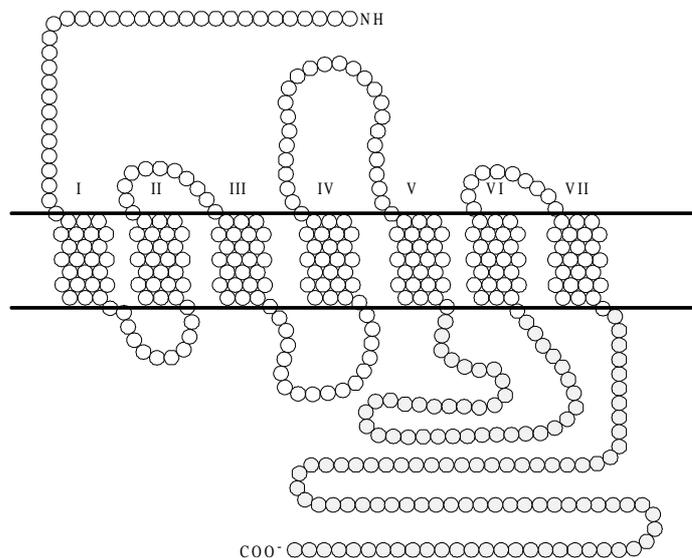


Abb. 1.4 Grundstruktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors

Alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren besitzen sieben transmembranäre Domänen (I-VII), die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen verbunden sind. Die dritte intrazelluläre Schleife und das C-terminale Ende spielen eine Rolle bei der Bindung des G-Proteins.

Anhand ihrer Sequenzhomologie werden drei Subfamilien unterschieden: die Rhodopsin/ β -Adrenozeptor-Familie, die Sekretin/Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)-Rezeptorfamilie und die Familie der metabotropen Glutamatrezeptoren (Strader et al., 1995). Die meisten der bisher über 300 identifizierten Rezeptoren gehören zur erstgenannten Familie.

Die Agonisten, die an die Rezeptoren der drei Subfamilien binden, gehören zu verschiedenen Substanzklassen. Dementsprechend unterscheiden sich auch die Regionen, die die Bindung des Liganden an den Rezeptor vermitteln (Abb. 1.5). Die Catecholamine, die Agonisten der Adrenozeptor-Subfamilie sind, interagieren mit den transmembranären Bereichen des Rezeptors. Durch Versuche mit systematischen Mutationen verschiedener Aminosäuren stellte sich heraus, daß insbesondere die transmembranären Domänen III, V und VI die Bindung vermitteln (Strader et al., 1989). Andere Neurotransmitter und kleinere Peptide, die ebenfalls als Agonisten dieser Rezeptorfamilie fungieren, binden an extrazelluläre Rezeptorregionen und ebenfalls an Bindungsstellen der Transmembranhelices.

Zur Sekretin/VIP-Rezeptorfamilie gehören unter anderem die Rezeptoren für Sekretin, Glucagon, *glucagon-like peptide-1* (GLP-1), *gastric inhibitory peptide* (GIP), VIP und Calcitonin. Diese Rezeptoren weisen untereinander 25-50% Homologie der Aminosäuresequenz auf, haben aber eine geringere Ähnlichkeit mit der Rhodopsin/ β -Adrenozeptor-Familie. Ein charakteristisches Merkmal dieser Subfamilie ist eine hydrophobe Domäne am N-Terminus, an die sich eine hydrophile Sequenz anschließt. Diese Region vermittelt die Rezeptor-Liganden-Bindung.

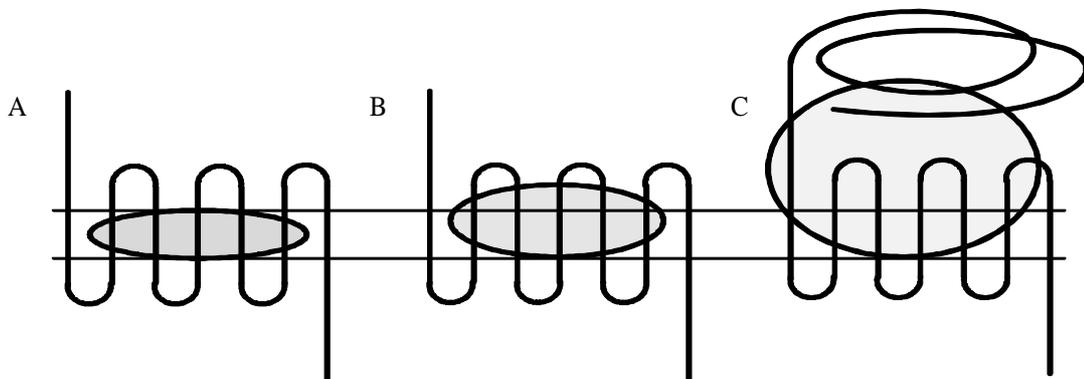


Abb. 1.5 Bindungsstellen für Liganden von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

A Die Bindungsstelle des Liganden liegt in einer hydrophilen Tasche, die von den transmembranären Helices gebildet wird. **B** Peptide haben neben der Transmembrandomäne noch Bindungsstellen an den extrazellulären Regionen. **C** Proteinrezeptoren sind durch die große extrazelluläre N-terminale Domäne charakterisiert, die die spezifische Ligandenbindung vermittelt. Zusätzlich werden auch Bindungsstellen an anderen Regionen vermutet (modifiziert nach Gudermann et al., 1995).

Die metabotropen Glutamaterezeptoren bilden die dritte Subfamilie (Bockaert et al., 1993). Diese Rezeptoren besitzen neben einem langen N-terminalen Ende auch eine lange

intrazelluläre C-terminale Region und unterscheiden sich dadurch von den anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren.

Die Regionen, welche die Bindung des G-Proteins vermitteln, unterscheiden sich bei verschiedenen Rezeptoren und sind auch für bestimmte G-Proteine unterschiedlich ausgeprägt (Savarese und Fraser, 1992). Es handelt sich aber immer um eine Kombination verschiedener intrazellulärer Regionen. Bei den meisten untersuchten Rezeptoren stellten sich die dritte cytoplasmatische Schleife, das intrazelluläre Ende der Transmembrandomäne III und die C-terminale Region nahe der Transmembrandomäne VII als die wichtigsten Bindungsstellen heraus (Übersicht bei Gudermann et al., 1995). In welchem Ausmaß diese Regionen bei einer bestimmten Rezeptor-G-Protein-Kopplung beteiligt sind, muß im Einzelfall experimentell bestimmt werden.

Neuere Ergebnisse lassen vermuten, daß an der Signaltransduktion über G-Proteine noch weitere, bisher unbekannte Proteine beteiligt sind. Sato et al. (1995) untersuchten die Rezeptor/G-Protein-Interaktion in verschiedenen rekonstituierten Zellsystemen. Bei identischen Rezeptor- bzw. G-Proteinmengen ist die Aktivierung des Effektors in PC-12 Zellen stärker ausgeprägt als in den anderen untersuchten Zellen. Daraufhin gelang die Isolierung eines Makromoleküls aus PC-12 Zellen, das konzentrationsabhängig die Bindung von GTP γ S an das G-Protein erhöht. Die Autoren schließen daraus, daß die Agonisten-induzierte Aktivierung des G-Proteins durch dieses noch nicht identifizierte Protein verstärkt wird. Auch wenn Rezeptor, G-Protein und Effektor die Hauptkomponenten des Signaltransduktionsweges sind, scheinen doch weitere Proteine direkt durch Beeinflussung der G-Proteinkopplung oder -aktivierung oder auch indirekt aufgrund von Kompartimentierungen mitbeteiligt zu sein.

1.1.4 Effektoren

G-Proteine vermitteln die Weiterleitung eines Signals vom Rezeptor auf einen Effektor. Bekannte G-Protein gekoppelte Effektoren sind auf der einen Seite Enzymsysteme wie Adenylylcyclasen und Phospholipasen und auf der anderen Seite Ionenkanäle, z. B. für K⁺ oder Ca²⁺. Aber entsprechend den Subtypen eines Rezeptors existieren auch auf der Ebene der Effektoren verschiedene Isoformen eines Enzyms, die sich in ihrer Substratspezifität oder Stimulierbarkeit unterscheiden. So wurden 16 verschiedene Phospholipase C Isoformen (Rhee und Choi, 1992) und acht verschiedene Adenylylcyclase-Typen (Iyengar, 1993) kloniert und charakterisiert.

1.1.4.1 Adenylylcyclase

Alle bisher identifizierten Adenylylcyclasen werden durch $G\alpha_s$ stimuliert und bilden daraufhin den *second messenger* cAMP. Daneben werden die verschiedenen Isoformen noch durch andere Signale in ihrer Aktivität moduliert (Abb. 1.6). Die Isoformen I und III werden durch Ca^{2+} /Calmodulin unabhängig von $G\alpha_s$ stimuliert. Inhibitorische G-Proteine und der $\beta\gamma$ -Komplex bewirken eine Hemmung. Die Typ II-Adenylylcyclase wird neben $G\alpha_s$ auch vom $\beta\gamma$ -Komplex und der Proteinkinase C aktiviert. Die Isoformen IV und VII ähneln in ihrem Verhalten der Typ II-Adenylylcyclase. Zur letzten Gruppe gehören die Isoformen V und VI. Beide werden von $G\alpha_s$ und verschiedenen Isoenzymen der Proteinkinase C aktiviert. Hemmend wirken inhibitorische G-Proteine und erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen (Übersicht bei DeVivo und Iyengar, 1994).

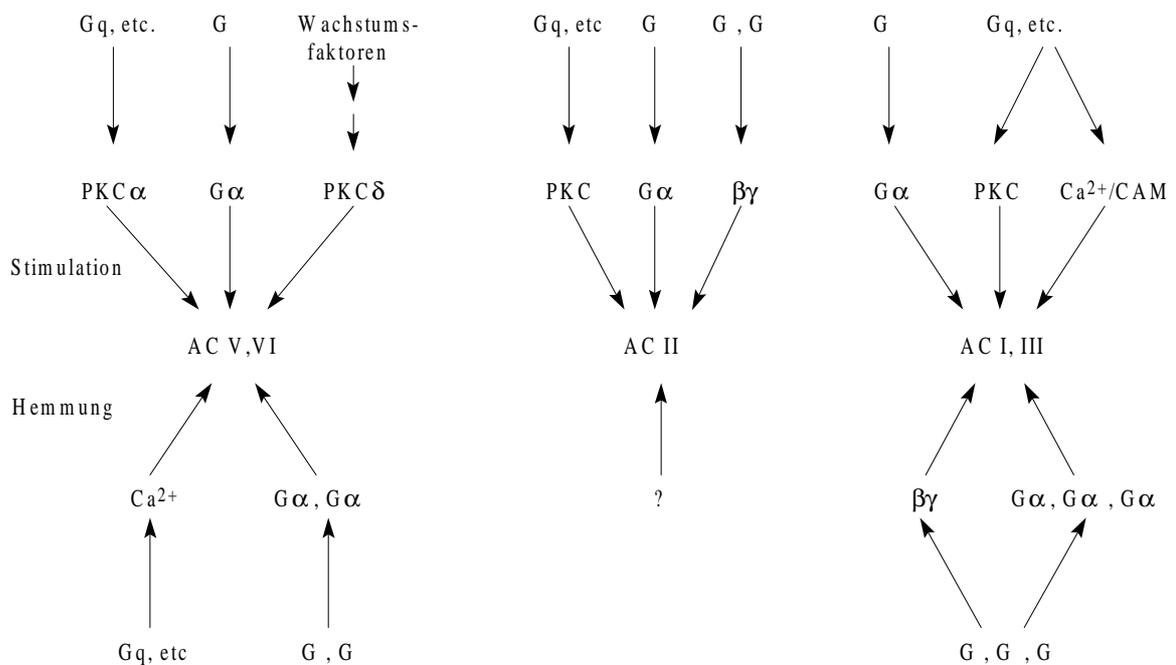


Abb. 1.6 Regulation der Adenylylcyclaseaktivität

Die verschiedenen Isoformen werden auf unterschiedlichem Wege aktiviert oder gehemmt (nach Taussig und Gilman, 1995).

Durch die Erhöhung der cAMP-Spiegel wird die Proteinkinase A aktiviert, die dann je nach Zellsystem verschiedene Proteine phosphorylieren kann.

1.1.4.2 Phospholipasen

Aus der Gruppe der Phospholipasen (PL) spielen PLC, PLD und PLA₂ eine Rolle bei der Signaltransduktion über G-Proteine. Daher werden sie auch als *signal-activated phospholipases* (SAP) bezeichnet (Liscovitch, 1992). Am besten untersucht ist in dieser Hinsicht die Phospholipase C. Durch biochemische Charakterisierung und Klonierung wurden drei Typen der Phospholipase C gefunden, die als PLC-β, PLC-γ und PLC-δ bezeichnet werden (Rhee und Choi, 1992). Von diesen werden nur die Isoenzyme der PLC-β durch G-Proteine aktiviert. Die PLC-β wird sowohl durch Pertussistoxin-sensitive, als auch durch Pertussistoxin-insensitive G-Proteine stimuliert. Als nicht Pertussistoxin-sensitive G-Proteine wurden die Mitglieder der G_q-Familie identifiziert, die die Isoenzyme PLC-β1, 2 und 3 aktivieren können (Hepler et al., 1993). Daneben kann die Aktivität der PLC-β auch durch den βγ-Komplex moduliert werden (Camps et al., 1992). Eine Stimulation der Phospholipase C durch das Pertussistoxin-sensitive G_o konnte an *Xenopus* Oocyten nachgewiesen werden (Moriarty et al., 1990). Es ist aber noch nicht endgültig geklärt, ob dies ein direkter Effekt ist.

Eine Aktivierung der Phospholipase C führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol, einem Zellmembranbestandteil. Es entstehen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG), die beide eine Rolle als *second messenger* bei der Signaltransduktion spielen. Das in das Cytosol freigesetzte IP₃ vermittelt seine Wirkung über die Bindung an einen intrazellulären Ca²⁺-Kanal am Endoplasmatischen Reticulum. Das membranständige Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Sie gehört zur Gruppe der Serin/Threonin-phosphorylierenden Kinasen. Es wurden 12 verschiedene Isoenzyme der Proteinkinase C identifiziert (Akimoto et al., 1994; Stabel, 1994), die sich in ihrer Stimulierbarkeit unterscheiden, aber einen ähnlichen strukturellen Aufbau besitzen. Sie bestehen aus einer Peptidkette, die in eine regulatorische Domäne am N-Terminus und eine katalytische Domäne am C-Terminus unterteilt werden kann (Lee und Bell, 1986). Nach der Translokation vom Cytosol zur Zellmembran wird die PKC durch DAG und Phosphatidylserin, das als Cofaktor fungiert, aktiviert. Bei einigen Isoenzymen erfolgen Translokation und Aktivierung Ca²⁺-abhängig. Nach Stimulation phosphoryliert die PKC bevorzugt basische Proteine. Zu ihren wichtigsten physiologischen Substraten gehören *myristoylated alanine-rich C kinase substrate* (MARCKS) und verwandte Proteine wie das *MARCKS-related protein* (MRP) (Übersicht bei Azzi et al., 1992). Daneben wird noch eine Vielzahl weiterer Proteine phosphoryliert (Jones et al., 1992).

Welche Rolle die Aktivierung mittels G-Proteinen für Phospholipase A₂ und D spielt, ist weniger gut untersucht. Von Phospholipase D konnten ebenfalls unterschiedliche Isoenzyme identifiziert werden, die sich in ihrer Substratspezifität und bezüglich ihrer Stimulierbarkeit unterscheiden (Liscovitch et al., 1996). Die Aktivierung durch Wachstumshormone kann über G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität erfolgen (Boarder, 1994).

Auch bei der Phospholipase A₂ lassen sich verschiedene Isoformen unterscheiden, die extrazellulär, cytosolisch oder an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert sind (Mayer und Marshall, 1993). Es wird vermutet, daß bei Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration eine Translokation der PLA₂ vom Cytosol zur Zellmembran stattfindet und so erst die Möglichkeit zur Interaktion mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren geschaffen wird (Liscovitch, 1992).

1.1.4.3 Ionenkanäle

G-Proteine können Ionenkanäle direkt oder indirekt beeinflussen. Indirekte Effekte werden über *second messenger* wie cAMP, DAG oder IP₃ vermittelt, die nach Aktivierung von Enzymsystemen durch G-Proteine gebildet werden. Durch die Erhöhung der cAMP-Spiegel wird die Proteinkinase A aktiviert, die spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle phosphorylieren und so einen Ca²⁺-Einstrom in die Zelle auslösen kann (Yatani und Brown, 1989). Auch über das Phospholipase C-System können Ca²⁺-Kanäle beeinflusst werden. Die Aktivierung der Proteinkinase C durch DAG erhöht nach Phosphorylierung des Kanalproteins dessen Offenwahrscheinlichkeit (Gollasch et al., 1993).

G-Proteine können Ionenkanäle auch unabhängig von *second messenger* Systemen aktivieren oder hemmen. Um diese Interaktion testen zu können, müssen die Ionenkanäle unter Ausschaltung anderer Signaltransduktionwege der Zelle untersucht werden. Derartige Messungen ermöglicht die *inside-out patch-clamp* Technik, bei der nur der Ionenkanal isoliert vom Zellinhalt bestimmten Substanzen ausgesetzt werden kann. Auf diese Weise wurde die direkte Wechselwirkung von G_{i3} mit K⁺-Kanälen des Herzens nachgewiesen (Yatani et al., 1987). Weitere Versuche zeigten, daß neben G_{i3} auch G_{i1}, G_{i2} und G_{o1} K⁺-Kanäle in verschiedenen Geweben oder Zelllinien aktivieren können (Übersicht bei Birnbaumer et al., 1990 a). Die direkte Wirkung wird von den α-Untereinheiten vermittelt, aber der βγ-Komplex kann ebenfalls, allerdings indirekt über die Aktivierung der Phospholipase A₂, K⁺-Kanäle öffnen (Kim et al., 1989).

Untersuchungen am Herzen zeigten, daß G_s unabhängig von der Stimulation der Adenylylcyclase einen schnellen Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle hervorrufen kann, der auf eine direkte Kopplung von G_s an den Ca^{2+} -Kanal hinweist (Yatani und Brown, 1989). In GH_3 -Zellen scheint G_{12} Ca^{2+} -Kanäle direkt aktivieren zu können (Gollasch et al., 1993), während in anderen Geweben oder Zelllinien über inhibitorische G-Proteine eine Hemmung von Ca^{2+} -Kanälen vermittelt wird (Übersicht bei Birnbaumer et al., 1990 a).

1.2 Insulinsekretion

Die Sekretion von Insulin aus den B-Zellen der Langerhansschen Inseln dient der Regulation des Blutglucosespiegels. Steigt nach Nahrungsaufnahme die Glucosekonzentration im Blut an, wird Insulin durch Exocytose aus den Speichergranula freigesetzt. An den Erfolgsorganen bewirkt es daraufhin eine erhöhte Glucoseaufnahme in die Zellen, Steigerung der Glykogenbildung in Leber und Muskel und vermehrten oxidativen Glucoseabbau.

1.2.1 Glucose-induzierte Insulinsekretion

Das wichtigste Stimulans der Insulinsekretion ist Glucose. Daneben können andere Kohlenhydrate sowie ihre Metabolisierungsprodukte, die Aminosäuren Arginin und Leucin und auch Arzneistoffe aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe die Freisetzung von Insulin hervorrufen. Diese Substanzen, die die Insulinsekretion induzieren können, bezeichnet man als Initiatoren. Im Gegensatz dazu beeinflussen Modulatoren die Insulinsekretion nur bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Initiators. Zu den Modulatoren gehören zum Beispiel Neurotransmitter wie Adrenalin oder Acetylcholin und die Inkretinhormone (Kap. 1.2.3). Diese Substanzen vermitteln ihre Wirkung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Kap. 1.1.3).

Die Voraussetzung für die Stimulation der Insulinsekretion durch Glucose stellt ihre Aufnahme in die B-Zelle dar. Glucose wird durch Glucosetransporter (GLUT) aktiv ins Zellinnere befördert (Übersicht bei Newgard et al., 1994). An den Langerhansschen Inseln der Ratte wird die Glucoseaufnahme hauptsächlich durch den Subtyp GLUT-2 vermittelt (Thorens et al., 1988; Johnson et al., 1990). Glucose induziert die Insulinsekretion nicht durch die Bindung an einen Rezeptor, sondern über die nach ihrer Metabolisierung gebildeten Stoffwechselprodukte. Die erste Reaktion ist die Phosphorylierung zu Glucose-6-phosphat durch verschiedene Hexokinasen. Die Hexokinasen I, II und III besitzen K_m -Werte für

Glucose, die niedriger als 0,1 mmol/l sind, so daß diese Enzyme schon bei basalen Blutglucosespiegeln aktiv sind. Die Hexokinase IV wird erst von Glucosekonzentrationen ab 10 mmol/l angesprochen und ist somit für die gesteigerte Metabolisierungsrate bei erhöhten Blutzuckerspiegeln verantwortlich (Wilson, 1984). Aufgrund ihrer Substratspezifität wird die Hexokinase IV auch als Glucokinase bezeichnet. Die wichtige Bedeutung der Glucokinaseaktivität für die Glucose-induzierte Insulinsekretion zeigt das Sekretionsverhalten der Zelllinie RINm5F. Diesen Zellen fehlt die Glucokinaseaktivität und sie reagieren daher auf eine Steigerung der Glucosekonzentration nicht mit verstärkter Glucosemetabolisierung und auch nicht mit erhöhter Insulinsekretion (Halban et al., 1983). Die Glucokinase dient also als Glucosesensor der B-Zelle und generiert den ersten Metaboliten der Signalkaskade, die zur Freisetzung von Insulin führt (Matschinsky, 1990).

Das durch Phosphorylierung entstandene Glucose-6-phosphat wird in der Glykolyse weiter umgesetzt. Schon hierbei entsteht neben $\text{NADH}+\text{H}^+$ und Pyruvat auch ATP. Das Pyruvat wird in die Mitochondrien eingeschleust, in denen die oxidative Decarboxylierung erfolgt. Deren Produkt Acetyl-CoA geht in den Citronensäurezyklus ein, wo wiederum $\text{NADH}+\text{H}^+$ und ATP gebildet werden. Die neben ATP entstehenden Metaboliten können die Insulinsekretion weiter verstärken. Fructose-1,6-bisphosphat und Diphosphoglycerinsäure bewirken eine Erhöhung der IP_3 -Konzentration vermutlich über die Hemmung des IP_3 -Abbaus mittels Phosphatasen (Laychock, 1990). Andere noch nicht genau charakterisierte Metabolite, bei denen es sich um Acyl-CoA Derivate handeln kann, stimulieren die Phospholipase C (Rasmussen et al., 1995). Durch die Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten werden ATP-abhängige K^+ -Kanäle der B-Zelle geschlossen. Infolge der Abnahme der Kaliumpermeabilität wird die Zelle depolarisiert, wodurch sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle öffnen und Ca^{2+} in die B-Zelle einströmt. Die Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt die Öffnung von Ca^{2+} -sensitiven K^+ -Kanälen. Durch den K^+ -Ausstrom wird die Zelle repolarisiert, so daß die Ca^{2+} -Kanäle sich wieder schließen. Wenn der ATP/ADP-Quotient noch erhöht ist, wird über die Schließung der ATP-abhängigen K^+ -Kanäle die B-Zelle wieder depolarisiert und es erfolgt erneut ein Ca^{2+} -Einstrom. Durch dieses Wechselspiel zwischen Depolarisation und Repolarisation entstehen oszillierende Ca^{2+} -Ströme, die mit der pulsatilem Insulinfreisetzung korrelieren (Lund und Hellman, 1992; Bergsten, 1995). Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist der Trigger für die kontrollierte Exozytose (Burgess und Kelly, 1987).

Sie vermittelt eine Signalkaskade, die schließlich zur Fusion der exozytotischen Granula mit der Zellmembran führt.

1.2.2 Mediatoren der Insulinsekretion

1.2.2.1 Calcium

Der auslösende Faktor für die Freisetzung von Insulin ist eine Erhöhung der freien cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. An B-Zellen der Ratte wurden zwei Typen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen identifiziert: T-Typ Kanäle und L-Typ Kanäle (Sala und Matteson, 1990; Ashcroft et al., 1990). Diese Kanäle unterscheiden sich in ihrer Spannungsempfindlichkeit, ihrem Öffnungsverhalten und ihrer Sensitivität gegenüber Agonisten. L-Typ Kanäle (*long lasting*) spielen für die Insulinsekretion die größere Rolle. Sie werden durch Dihydropyridine, Diltiazem oder Verapamil blockiert. Die Bedeutung des Ca^{2+} -Einstroms für die Insulinsekretion wurde durch Versuche deutlich, in denen das Entfernen von Ca^{2+} aus dem Medium oder der Einsatz von Ca^{2+} -Kanalblockern die Freisetzung von Insulin verhindern konnten (Prentki und Matschinsky, 1987).

Der genaue Mechanismus, über den eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration die Exozytose auslöst, ist noch nicht bekannt. Verschiedene Angriffspunkte für Ca^{2+} werden diskutiert. Ca^{2+} bindet an Calmodulin und aktiviert die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II. Dieses Enzym phosphoryliert nachfolgend weitere Proteine, die den Vesikeltransport zur Zellmembran beeinflussen (Ashcroft und Hughes, 1990). Auch die Proteinkinase C scheint eine Rolle bei der Ca^{2+} -induzierten Vesikelfusion zu spielen (Calle et al., 1992). Durch den Ca^{2+} -Einstrom wird also eine Signalkaskade eingeleitet, die schließlich zur Exozytose der Insulingranula führt. Daher kann die Ca^{2+} -induzierte Insulinsekretion auch distal noch weiter moduliert werden. So zeigten Ullrich und Wollheim (1988), daß in permeabilisierten RINm5F-Zellen die Ca^{2+} -induzierte Freisetzung von Insulin durch Adrenalin gehemmt werden kann. Die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration stellt also einen wichtigen, aber nicht den letzten Schritt auf dem Weg zur Insulinsekretion dar.

1.2.2.2 Phospholipase C-System

Neben der Aktivierung der Phospholipase C durch G-Proteine (Kap. 1.1.4.2) wird die Isoform PLC- δ unter anderem durch Ca^{2+} aktiviert (Best, 1986; Biden et al., 1993; Kelley et

al., 1995). Glucose kann daher über die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die PLC- δ aktivieren. Außerdem können Metaboliten, die bei der Verstoffwechslung der Glucose in der B-Zelle entstehen, eine Isoform der PLC auch Ca^{2+} -unabhängig aktivieren (Rasmussen et al., 1995). Eine besondere Rolle spielt die Stimulation der PLC für die biphasische Insulinsekretion von Langerhansschen Inseln der Ratte und des Menschen. Wird die PLC nicht ausreichend aktiviert, wie dies bei Mäuseinseln der Fall ist, so ist die zweite Phase der Insulinsekretion nur schwach ausgeprägt (Übersicht bei Zawalich und Zawalich, 1996).

Nach Stimulierung der PLC wird Phosphatidylinosit-3,4-bisphosphat zu IP_3 und DAG hydrolysiert. DAG kann auch durch Neusynthese aus Dihydroxyaceton gebildet werden. Dieser zweite Mechanismus wird insbesondere durch Glucose stimuliert (Zawalich und Rasmussen, 1990). IP_3 bewirkt die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Endoplasmatischen Reticulum, was zu einer Verstärkung der Insulinsekretion führen kann. In Abwesenheit von Glucose löst die Erhöhung der IP_3 -Spiegel aber keine Insulinsekretion aus (Zawalich et al., 1989). Ob die verschiedenen Inositolphosphatmetaboliten ebenfalls die Freisetzung von Insulin beeinflussen, ist noch unbekannt. DAG stimuliert die Proteinkinase C. Verschiedene Autoren konnten zeigen, daß die Aktivierung der PKC eine Steigerung der Insulinsekretion hervorruft (Arkhammar et al., 1989; Thams et al., 1990; Jones et al., 1992). Dieser Effekt kann über eine Steigerung der Empfindlichkeit des Sekretionsmechanismus gegenüber Ca^{2+} vermittelt sein (Jones et al., 1985; Hughes et al., 1987). Außerdem kann die PKC die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration regulieren (Arkhammar et al., 1994; Bode und Göke, 1994) und die Adenylylcyclase stimulieren (Thams et al., 1988). Ob diese Mechanismen allerdings bei der Glucose-induzierten Insulinsekretion eine entscheidende Rolle spielen, wird kontrovers diskutiert (Übersicht bei Zawalich und Zawalich, 1996).

1.2.2.3 Phospholipase A_2 -System

Die Aktivierung der Phospholipase A_2 führt zur Hydrolyse von Phospholipiden der Zellmembran. Dabei entstehen Lysophospholipide und Arachidonsäure. Die Phospholipase A_2 wird durch *second messenger* wie cAMP und Ca^{2+} stimuliert. Daneben wird auch eine Aktivierung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren diskutiert (Kap. 1.1.4.2). Phospholipase A_2 wurde in den B-Zellen des Pankreas und in insulinsezernierenden Zelllinien identifiziert (Metz et al., 1991). Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß bei erhöhter Glucosekonzentration der Anstieg der Insulinsekretionsrate mit einer Steigerung des Gehalts

an Arachidonsäure und deren Metabolisierungsprodukten einhergeht (Turk et al., 1984). Wie es zur Glucose-induzierten Aktivierung der Phospholipase A₂ kommt, wird kontrovers diskutiert. Ein Isoenzym der Phospholipase A₂ wird Ca²⁺-abhängig stimuliert, so daß Glucose durch die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration dessen Aktivierung bewirken kann (Metz, 1988 b; Jolly et al., 1993). Außerdem kann Arachidonsäure auch durch Hydrolyse von Diacylglycerol gebildet werden. Die Inkubation von Inseln mit exogener Arachidonsäure führt zur Freisetzung von Ca²⁺ aus Zellorganellen und zur Stimulation der Insulinsekretion (Metz, 1988). Versuche mit Hemmstoffen des Arachidonsäurestoffwechsels zeigten, daß Arachidonsäuremetaboliten an der Insulinsekretion beteiligt sein können. Eicosa-5,8,11,14-tetraynsäure, die die Synthese von Lipoxygenase- und Cyclooxygenaseprodukten hemmt, senkt die Glucose-induzierte Insulinsekretion um ca. 70 %. Indometacin, ein Cyclooxygenase-Inhibitor, hat keinen Effekt (Turk et al., 1984). Diese Untersuchungen weisen auf eine wichtige Rolle des Phospholipase A₂/Arachidonsäure-Systems bei der Regulation der Insulinsekretion hin (Übersicht bei Jones und Persaud, 1993).

1.2.2.4 Adenylylcyclase-System

Die Adenylylcyclase katalysiert die Umsetzung von ATP zu cAMP. Von diesem Enzym wurden verschiedene Isoformen identifiziert (Kap. 1.1.4.1), die sich anhand ihrer Aktivierbarkeit unterscheiden. Glucose selbst kann die Adenylylcyclase nicht direkt aktivieren. Da Glucose aber einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration hervorruft, kann eine Stimulation von Ca²⁺/Calmodulin-sensitiven Isoformen der Adenylylcyclase erfolgen. Durch eine Erhöhung der cAMP-Spiegel wird die Proteinkinase A aktiviert. Sie phosphoryliert verschiedene Proteine der B-Zelle und verstärkt darüber die Ca²⁺-Empfindlichkeit des Sekretionsmechanismus (Ashcroft et al., 1994). Ein alleiniger Anstieg des Gehalts an cAMP, der nicht von erhöhten Glucosespiegeln begleitet ist, führt aber nicht zu einer Steigerung der Insulinsekretion. Glucose selbst bewirkt auch nur eine geringe und kurzzeitige Zunahme an cAMP. Beides deutet darauf hin, daß cAMP nicht der auslösende Faktor der durch Glucose hervorgerufenen Insulinsekretion sein kann (Persaud et al., 1990). Eine wichtige Rolle spielt die Erhöhung der cAMP-Spiegel aber für die hormonell gesteuerte Potenzierung der Glucose-induzierten Insulinsekretion.

1.2.3 Stimulatoren der Insulinsekretion

Die Glucose-induzierte Insulinsekretion kann durch verschiedene Hormone oder Neurotransmitter moduliert werden. Als Stimulatoren der Insulinsekretion spielen Hormone, die nach Nahrungsaufnahme vom Darm freigesetzt werden, die wichtigste Rolle. Die orale Aufnahme von Glucose ruft einen weitaus stärkeren Anstieg der Plasmainsulinspiegel hervor, als eine intravenöse Glucoseinjektion, die zum gleichen Blutzuckerspiegel führt. Die Insulinsekretion ist je nach aufgenommener Glucosemenge nach oraler Gabe 20-60% höher (Creutzfeld und Nauck, 1992). Diese Steigerung bezeichnet man als Inkretineffekt. Ende der zwanziger Jahre konnten endokrine Faktoren identifiziert werden, die vom Darm freigesetzt werden und die Insulinsekretion steigern. Diese Faktoren wurden von LaBarre (1932) zusammenfassend als Inkretin bezeichnet. Der Begriff enteroinsuläre Achse (Unger und Eisentraut, 1969) beschreibt die Wirkung dieser Darmhormone auf das endocrine Pankreas. Eine Vielzahl an Peptiden wurde daraufhin aus Darmextrakten isoliert. Darunter waren Sekretin, Cholezystokinin (CCK), *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP), Gastrin, *gastrin releasing peptide* (GRP) und Enteroglucagon, die in Anwesenheit basaler oder leicht erhöhter Glucosekonzentrationen die Insulinsekretion stimulieren können (Übersichten bei Ebert und Creutzfeld, 1987; Dupré, 1991). Die Wirkung dieser Peptide ist aber auch in hohen Konzentrationen nur schwach ausgeprägt. Rushakoff et al. (1990) formulierten vier Bedingungen, die ein Hormon erfüllen muß, damit man es als Inkretin betrachten kann. Erstens soll es in den Epithelzellen des Darms produziert und durch verschiedene oral aufgenommene Nährstoffe, d. h. nicht ausschließlich Glucose, freigesetzt werden. Zweitens soll die exogene Gabe des Hormons bei physiologischen Plasmakonzentrationen die Glucose-induzierte, aber nicht die basale Insulinsekretion erhöhen. Außerdem können spezifische Rezeptorantagonisten oder Antikörper gegen das Hormon die postprandiale Insulinsekretion vermindern. Schließlich müssen Rezeptoren für das Hormon an den B-Zellen des Pankreas vorhanden sein.

Von den oben genannten Peptiden erfüllt keines alle vier Kriterien. Zwei andere Hormone entsprechen aber den Bedingungen, die an ein Inkretin gestellt werden: *gastric inhibitory peptide* (GIP) und *glucagon-like peptide-1* (GLP-1). Sie werden nach Nahrungsaufnahme aus dem Darm freigesetzt und steigern dann die Insulinsekretion. Durch den Einsatz von Antagonisten konnte der Beitrag beider Hormone zum Inkretineffekt bestimmt werden. Die Gabe von Exendin(9-39)amid, einem Antagonisten des GLP-1-Rezeptors, verringert den Inkretineffekt um 60% (Kolligs et al., 1995). GIP macht 30-50% der Inkretinwirkung aus,

wie Versuche mit GIP-Antikörpern zeigten (Ebert und Creutzfeld, 1982). Diese beiden Hormone können in Kombination den Inkretineffekt in vollem Umfang hervorrufen und stellen damit die wichtigsten physiologischen Modulatoren der Glucose-induzierten Insulinsekretion dar.

1.2.3.1 GIP

Gastric inhibitory peptide wurde aufgrund seiner hemmenden Wirkung auf die Säureproduktion entdeckt (Brown et al., 1975). Seit die Wirkung auf die Insulinsekretion bekannt ist, wird es unter Beibehaltung der Abkürzung GIP auch als *glucose-dependent insulinotropic polypeptide* oder *glucose-dependent insulin-releasing polypeptide* bezeichnet. GIP besteht aus einer Peptidkette von 42 Aminosäuren. Es ist strukturell verwandt mit den anderen Peptiden der Sekretin- und der Glucagonfamilie, zum Beispiel Glucagon, Glicentin, GLP-1, GLP-2 oder Sekretin.

GIP wird nur in wenigen Geweben exprimiert. Die höchste Konzentration findet man im Duodenum und im oberen Jejunum (Polak et al., 1973; O'Dorisio et al., 1976; Buchan et al., 1978). Bei Ratte und Kaninchen konnte es in geringen Konzentrationen auch im Ileum nachgewiesen werden (Buchan et al., 1982). Diese Gewebeverteilung stimmt mit immunocytochemischen Untersuchungen überein, die zeigten, daß GIP in den K-Zellen des oberen Dünndarms lokalisiert ist (Buffa et al., 1975). Aus diesen Zellen wird GIP nach Nahrungsaufnahme freigesetzt. Dabei stimulieren verschiedene Bestandteile der Nahrung die GIP-Sekretion. Untersuchungen am Menschen zeigten, daß Glucose die GIP-Freisetzung aus dem Duodenum, Fette dagegen hauptsächlich aus dem Jejunum hervorrufen (Schattenmann et al., 1984). Eine Aminosäuremischung induziert ebenfalls die GIP-Sekretion. Einzeln gegeben können aber nur bestimmte Aminosäuren die Freisetzung auslösen (Thomas et al., 1976 und 1978). Die Sekretion von GIP steht außerdem unter vagaler und adrenerger Kontrolle und wird konzentrationsabhängig durch *gastrin-releasing peptide* (GRP) gesteigert (Larrimer et al., 1978; Flaten et al., 1982; Kieffer et al., 1994).

Die beiden wichtigsten Zielorgane für GIP sind der Gastrointestinaltrakt und das Pankreas. Die Hemmung der Gastrinsekretion, die nach Entdeckung des Peptids zur Namensgebung diente, wird heute aufgrund widersprüchlicher Daten kontrovers diskutiert (Übersicht bei Fehmann et al., 1995). Der Einfluß auf die Insulinsekretion wird als Hauptwirkung angesehen. GIP stimuliert die Insulinsekretion entsprechend der Definition eines Inkretinhormons nur bei erhöhten Blutglucosespiegeln (Pederson und Brown, 1976). Seine

Wirkung vermittelt es über die Bindung an einen GIP-spezifischen Rezeptor. Der GIP-Rezeptor wurde an den B-Zellen des Pankreas und auch im Fettgewebe, im Gehirn und im Duodenum nachgewiesen (Usdin et al., 1993). Er gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, genauer zur Sekretin/VIP-Rezeptorfamilie (Kap. 1.1.3). Wie alle Mitglieder dieser Subfamilie ist er an G_s gekoppelt und bewirkt darüber eine Aktivierung der Adenylylcyclase mit nachfolgender Erhöhung der cAMP-Spiegel (Szecówka et al., 1982; Amiranoff et al., 1984; Volz et al., 1995; Wheeler et al., 1995). Darüber hinaus vermittelt GIP einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Brunicardi et al., 1986; Wahl et al., 1992; Lu et al., 1993). Beide Effekte treten nur bei gleichzeitig erhöhten Glucosespiegeln auf (Übersicht bei Dillon et al., 1994), so daß man annehmen kann, daß der Einfluß auf die cAMP- und Ca^{2+} -Spiegel die Ursache der insulinotropen Wirkung von GIP ist (Straub und Sharp, 1996).

1.2.3.2 GLP-1

Da die *in vivo* Immunoneutralisationsversuche von GIP gezeigt hatten, daß GIP alleine nur einen Teil des Inkretineffektes ausmacht (Ebert und Creutzfeld, 1982), wurde nach weiteren Inkretinhormonen gesucht. Die Charakterisierung von *glucagon-like peptide-1* (GLP-1), das entsprechend der Definition eines Inkretins aus Darmzellen freigesetzt wird, und die Entdeckung seiner starken stimulatorischen Wirkung auf die Insulinsekretion führten dazu, daß es als wichtiges Inkretin identifiziert wurde.

GLP-1 entsteht bei der Proteolyse von Preproglucagon (Abb. 1.7). Preproglucagon ist ein Protein, das aus 180 Aminosäuren besteht. Die Sequenz des Glucagons bilden die Aminosäuren 33 bis 61. Die beiden *glucagon-like peptides* GLP-1 und GLP-2 liegen zwischen den Positionen 72 bis 108 und 126 bis 158 (Bell et al., 1983). Preproglucagon wird sowohl in den intestinalen L-Zellen, als auch in den A-Zellen des Pankreas exprimiert. Die Proteolyse läuft aber in beiden Zellsystemen unterschiedlich ab, so daß die pankreatischen A-Zellen Glucagon, *glicentin related pancreatic polypeptide* (GRPP) und *major proglucagon fragment* (MPF) bilden. Die physiologische Funktion der letzten beiden Peptide ist noch nicht bekannt. Die intestinalen L-Zellen spalten Preproglucagon so, daß Glicentin, GLP-1 und GLP-2 entstehen (Patzelt und Schiltz, 1984; Mojsov et al., 1986).

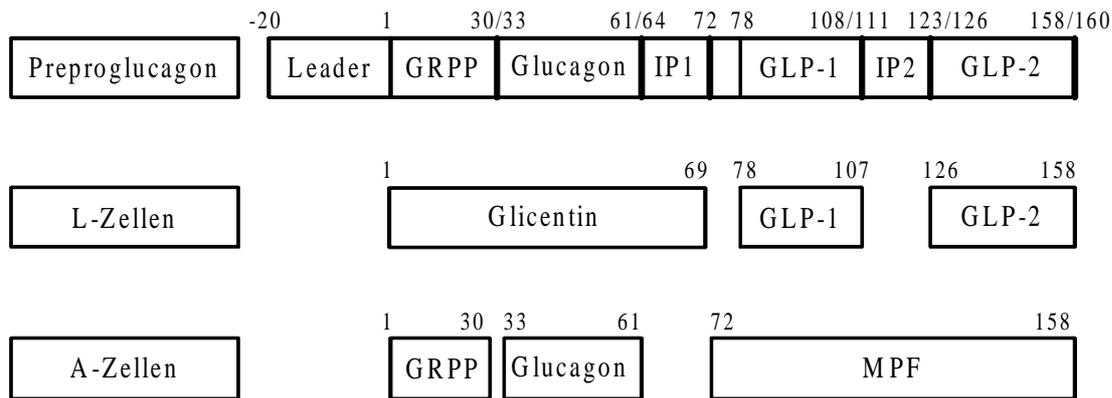


Abb. 1.7 Proteolyse des Preproglucagons in L-Zellen und in A-Zellen

Die Abkürzungen haben folgende Bedeutungen: GRPP (glicentin related polypeptide), IP1 und IP2 (intervening peptide 1 und 2), GLP (glucagon-like peptide), MPF (major proglucagon fragment) (aus Thorens et al., 1994).

Das biologisch inaktive GLP-1, das zunächst aus 37 Aminosäuren besteht, wird durch Abspaltung der sechs N-terminalen Aminosäuren zum biologisch aktiven GLP-1(7-37) umgesetzt (Mojsov et al., 1986). Bei einem großen Teil der Peptidmoleküle wird noch das C-terminale Ende um eine Aminosäure verkürzt und amidiert, so daß GLP-1(7-36)amid entsteht (Ørskov et al., 1989; Mojsov et al., 1990). Diese beiden Formen des aktiven GLP-1 besitzen die gleiche biologische Aktivität, wobei beim Menschen aber 80% als verkürztes, amidiertes Peptid vorliegen (Ørskov et al., 1994). Der Einfachheit halber wird im Verlauf dieser Arbeit statt von GLP-1(7-36)amid von GLP-1 gesprochen.

Die Gewebeverteilung von GLP-1 ergibt sich aus dem oben genannten Muster der proteolytischen Spaltung. GLP-1-Immunoreaktivität wurde in den L-Zellen des Darms nachgewiesen. Dabei steigt die Anzahl an GLP-1 bildenden Zellen vom Duodenum über Jejunum, Ileum und Colon an, um schließlich im Rektum die maximale Zelldichte zu erreichen (Eissele et al., 1992). In den L-Zellen findet man eine Co-Lokalisation von GLP-1 mit anderen Peptiden, die mittels Proteolyse aus Preproglucagon entstehen. GLP-1 wurde auch in der Medulla oblongata und im Hypothalamus mittels RIA nachgewiesen (Drucker et Asa, 1988; Lui et al., 1990). Außerdem existieren Bindungsstellen für GLP-1 in der Hypophyse (Göke et al., 1995).

Der Mechanismus, der nach Nahrungsaufnahme zur Freisetzung von GLP-1 aus den L-Zellen führt, ist noch nicht abschließend geklärt. Nährstoffe können die Sekretion von GLP-1 induzieren, wenn sie nicht im Dünndarm resorbiert werden und schließlich den Dickdarm

erreichen (Ørskov et al., 1986). Untersuchungen zeigen, daß die Blutspiegel von GLP-1 innerhalb von 10 bis 15 Minuten nach der Einnahme einer gemischten Mahlzeit ansteigen. Eine alleinige Auslösung der GLP-1-Sekretion durch Nahrungsbestandteile scheidet daher aus, da die Nährstoffe die tiefen Darmabschnitte, in denen der Hauptanteil an GLP-1 bildenden L-Zellen lokalisiert ist, erst sehr spät erreichen (Eissele et al., 1992). Im Tierversuch konnte die Freisetzung von GLP-1 durch GIP oder cholinerge Agonisten ausgelöst werden (Brubaker, 1991) und durch Galanin gehemmt werden (Herrmannrinke et al., 1996). Diese Ergebnisse ließen sich aber am Menschen nicht bestätigen (Übersicht bei Fehmann et al., 1995).

Die stimulierende Wirkung von GLP-1 auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion wurde zuerst 1987 am isolierten, perfundierten Pankreas nachgewiesen (Holst et al., 1987; Mojsov et al., 1987). Dieser Effekt tritt aber nur bei gleichzeitig erhöhten Glucosekonzentrationen auf. Die basale Insulinsekretionsrate bleibt unverändert. Fehmann et al. (1991) zeigten, daß eine kurze Vorbehandlung von insulinsezernierenden Zellen mit GLP-1 die Insulinsekretion bei nachfolgenden Stimulationen mit Glucose erhöht. Diese Wirkung wird auch als *priming effect* bezeichnet. Als Erklärung bieten Holz et al. (1993) die Beobachtung, daß nur ein Teil der B-Zellen des Pankreas unter normalen Bedingungen sensitiv gegenüber Glucose ist und daß die kurzzeitige Inkubation mit GLP-1 die Anzahl der Glucose-kompetenten Zellen erhöht. Der Einfluß von GLP-1 auf insulinsezernierende Zellen wird über spezifische Rezeptoren vermittelt (Göke und Conlon, 1988; Thorens, 1992; Moens et al., 1996). Der GLP-1-Rezeptor gehört wie der GIP-Rezeptor zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und zeigt Sequenzhomologie zu den Rezeptoren für Sekretin, VIP und Glucagon (Übersicht bei Fehmann et al., 1995). GLP-1 stimuliert nach Bindung an den Rezeptor die Adenylylcyclase, so daß die cAMP-Spiegel ansteigen (Drucker et al., 1987; Göke et al., 1989; Ahrén, 1996). Außerdem ruft GLP-1 eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hervor (Lu et al., 1993; Yada et al., 1993). Dieser Anstieg beruht nicht allein auf einer Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, sondern wird durch einen Ca^{2+} -Einstrom durch nicht-selektive Kationenkanäle unterstützt (Holz et al., 1995). Die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern kann als Trigger für die Öffnung der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle dienen (Gromada et al., 1996). Noch ist unklar, ob die Effekte auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ausschließlich über cAMP vermittelt werden, oder ob GLP-1 die Ca^{2+} -Kanäle auch direkt beeinflussen kann. GLP-1 stimuliert nicht nur die Glucose-induzierte Insulinsekretion, sondern erhöht auch die zellulären Spiegel der

Proinsulin-mRNA (Fehmann und Habener, 1992; Neye, 1996). Auf diese Weise erfüllt es in vollem Maße die Anforderungen eines Inkretinhormons, da es nicht nur die Insulinfreisetzung, sondern auch die Insulinbiosynthese steigert.

Neben diesen Effekten auf die Insulinsekretion hat GLP-1 auch extrapancreatische Wirkungen. Rezeptoren für GLP-1 wurden in der Lunge gefunden (Richter et al., 1990). Dort stimuliert GLP-1 die Mucussekretion und wirkt relaxierend auf die Pulmonalgefäße (Richter et al., 1993). Im Fettgewebe erhöht es die Lipolyse (Ruiz-Grande et al., 1992). Der Nachweis von Rezeptoren im Gehirn deutet darauf hin, daß GLP-1 Funktionen als Neurotransmitter, vermutlich bei der Regulation autonomer und neuroendokriner Prozesse, übernimmt.

Die Glucose-abhängige Stimulation der Insulinsekretion macht GLP-1 zu einer interessanten Substanz für die Therapie des Diabetes mellitus vom Typ II. Bei diesem auch als nicht-insulinabhängiger Diabetes bezeichneten Krankheitsbild liegt eine Insulinresistenz der Erfolgsorgane und/oder ein Defekt der Insulinsekretion vor. Die Infusion von GLP-1 zeigt einen antidiabetischen Effekt bei Patienten mit Typ II-Diabetes (Gutniak et al., 1992; Nauck et al., 1993). Die kombinierte Gabe von GLP-1 und Glibenclamid senkt die Blutglucosespiegel stärker als die alleinige Anwendung eines der beiden Arzneistoffe (Gutniak et al., 1996). Weitere Studien mit GLP-1 werden zeigen, ob GLP-1 als Arzneistoff Eingang in die Diabetestherapie finden wird.

1.2.4 Inhibitoren der Insulinsekretion

1.2.4.1 α_2 -Adrenozeptoragonisten

Bei der Regulation der Insulinsekretion greift das vegetative Nervensystem modulierend ein. Das endokrine Pankreas wird von sympathischen, parasympathischen und peptidergen Neuronen innerviert. Die Nervenfasern des vegetativen Nervensystems, die in das Pankreas eindringen, sind gemischte Fasern, das heißt, sie enthalten einen sympathischen und einen parasympathischen Anteil. Beide Nervenbahnen verlaufen entlang den Arterien. Die präganglionären parasympathischen Fasern des Nervus vagus enden in Ganglien innerhalb des Pankreas, wo die Umschaltung auf das postganglionäre Neuron erfolgt, das direkt die Zellen der Langerhansschen Insel innerviert. Das dort ausgeschüttete Acetylcholin führt an der B-Zelle über den Angriff an muskarinischen M_3 -Rezeptoren zur Stimulation der Insulinsekretion (Verspohl et al., 1990). In den Vesikeln der parasympathischen Nerven

findet man eine Co-Lokalisation von Acetylcholin und Neuropeptiden wie *vasoactive intestinal peptide* (VIP) oder *gastrin-releasing peptide* (GRP). Diese Neuropeptide werden nach Vagus-Aktivierung ebenfalls ausgeschüttet und verstärken die Freisetzung von Insulin.

Die postganglionären sympathischen Neurone verlaufen ausgehend vom Nervus splanchnicus in das Pankreas (Brunicardi et al., 1987). Der Neurotransmitter Noradrenalin vermittelt seine Wirkung an den Zellen der Langerhansschen Insel über β - und über α -Adrenozeptoren (Lacey et al., 1993). Der Angriff an β -Adrenozeptoren bewirkt eine schwache Steigerung der Insulinsekretion, während über α_2 -Adrenozeptoren eine ausgeprägte Hemmung der Insulinsekretion hervorgerufen wird. Auch in den sympathischen Nervenendigungen findet man eine Co-Lokalisation von Noradrenalin mit peptidergen Neurotransmittern, insbesondere mit Galanin (Kap. 1.2.4.3) (Dunning et al., 1986).

Schon 1966 zeigten Porte und Williams, daß die Stimulation sympathischer Nerven des Pankreas die Insulinsekretion hemmt. Versuche mit Noradrenalin und selektiven α_2 -Rezeptoragonisten machten deutlich, daß diese Wirkung über α_2 -Adrenozeptoren vermittelt wird (Metz et al., 1978). Inzwischen sind auch verschiedene Subtypen des α_2 -Adrenozeptors bekannt. Anhand unterschiedlicher Affinitäten von Antagonisten wurden die vier Subtypen α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} und α_{2D} identifiziert (Übersicht bei MacKinnon et al., 1994). Für die Hemmung der Insulinsekretion ist der an den B-Zellen lokalisierte α_{2A} -Adrenozeptor verantwortlich (Niddam et al., 1990). Adrenozeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Kap. 1.1.3). Untersuchungen mit Pertussistoxin zeigten, daß Pertussistoxin-sensitive G-Proteine an der Wirkung, die über α_2 -Adrenozeptoren vermittelt wird, beteiligt sind (Hillaire-Buys et al., 1992). Der α_2 -Adrenozeptor interagiert mit verschiedenen G-Proteinen. An RINm5F-Zellen konnte nachgewiesen werden, daß G_{i2} und beide Formen von G_o an α_2 -Adrenozeptoren koppeln (Schmidt et al., 1991).

Die Hemmung der Insulinsekretion wird über verschiedene Mechanismen hervorgerufen. Über G_{i2} wird die Adenylylcyclase gehemmt, so daß der cAMP-Spiegel sinkt (Macrezlepretre et al., 1995). Außerdem bewirkt die Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren eine Verminderung des Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle (Wollheim et al., 1977; Hsu et al., 1991). Die Öffnung von G-Protein gekoppelten K^+ -Kanälen wirkt aufgrund der entstehenden Hyperpolarisation einer Insulinsekretion entgegen (Rorsman et al., 1991). Solche durch G-Proteine aktivierbaren K^+ -Kanäle wurden auch an anderen sekretorischen Zellsystemen, zum Beispiel an chromaffinen Zellen und Mastzellen nachgewiesen, wo sie durch ihre Öffnung die Exocytose

beeinflussen können (McCloskey und Cahalan, 1990; Cannon et al., 1993). Neuere Untersuchungen zeigen, daß über α_2 -Adrenozeptoren auch der Einstrom von Na^+ , der an der Depolarisation der Zellmembran beteiligt ist, vermindert wird (Saha und Hellman, 1995). Diese vier Mechanismen reichen aber nicht aus, um die über α_2 -Adrenozeptoren vermittelte Hemmung der Insulinsekretion ausreichend zu erklären. Die Gabe von cAMP-Analoga kann die inhibitorische Wirkung von Clonidin nicht verhindern und auch bei erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration kann die Insulinsekretion durch α_2 -Adrenozeptoragonisten noch gehemmt werden (Ullrich und Wollheim, 1988). Daran wird deutlich, daß α_2 -Adrenozeptoragonisten über die Bindung an ihren Rezeptor die Freisetzung von Insulin unabhängig von der cAMP-Bildung und an einem Punkt distal der Erhöhung der Ca^{2+} -Spiegel beeinflussen können.

1.2.4.2 Lithium

Lithium wird zur Behandlung und Prophylaxe von manisch-depressiven und schizoaffektiven Psychosen eingesetzt. Im Tierversuch und auch am Menschen zeigte sich, daß Lithium die Glucosetoleranz und die Insulinsekretion beeinflussen kann. Die Behandlung von Ratten mit Lithium führt zu einer Verminderung der Glucose-induzierten Insulinsekretion (Anderson und Blackard, 1978; Shah und Pishdad, 1980). Untersuchungen zum Wirkmechanismus zeigten, daß der Effekt von Lithium durch die Gabe des nicht selektiven α -Adrenozeptorantagonisten Dihydroergotamin an isolierten Langerhansschen Inseln verhindert wird (Fontanela et al., 1987). An Ratten hat neben Dihydroergotamin auch eine Adrenalectomie den gleichen Effekt (Fontanela et al., 1986). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß Catecholamine an der Wirkung von Lithium auf die Insulinsekretion beteiligt sind. Durch Einsatz spezifischer α_2 -Adrenozeptorantagonisten konnten Fontanela et al. (1990) zeigen, daß Lithium seinen hemmenden Einfluß über diesen Rezeptorsubtyp vermittelt (Kap. 1.2.4.1). Wird die Signaltransduktion über α_2 -Adrenozeptoren durch den Einsatz von Pertussistoxin, das das koppelnde G_{i2} inaktiviert, unterbrochen, so kehrt sich der Effekt von Lithium ins Gegenteil um, und man beobachtet einen Anstieg der Plasmainsulinspiegel (García Hermida et al., 1991). Auch dies ist ein Hinweis, daß Lithium seine Wirkung über die Freisetzung von Catecholaminen hervorruft. Nach Inkubation mit Pertussistoxin bleibt der β -Adrenozeptor funktionsfähig und vermittelt eine Steigerung der Insulinsekretion (Kap. 1.2.4.1). Die Aktivierung des adrenergen Systems stellt also einen wichtigen Wirkmechanismus der Lithium-induzierten Hemmung der Insulinsekretion dar.

Daneben konnten Zawalich et al. (1989 b) auch einen Catecholamin-unabhängigen Effekt von Lithium auf die Insulinsekretion nachweisen. Lithium hemmt die Inositolmonophosphatase, so daß die verfügbare Menge an freiem Inositol abnimmt und der Signaltransduktionsweg des Phospholipase C-Systems (Kap. 1.2.2.2) beeinträchtigt wird (Übersicht bei Manji et al., 1995). Dieser Mechanismus scheint auch beim Einfluß von Lithium auf die Insulinsekretion eine Rolle zu spielen, denn die zusätzliche Gabe von Inositol verhindert den hemmenden Effekt von Lithium (Zawalich et al., 1989b).

Bei Untersuchungen am Menschen stellte sich der Einfluß von Lithium nicht so eindeutig dar. Während einige Autoren ebenso wie im Tierversuch und an isolierten Inseln eine verminderte Insulinsekretion feststellten, konnten andere eine Verbesserung der Glucosetoleranz nachweisen (Jones et al., 1983; Caviezel et al., 1987). Die Ursache dieser antidiabetischen Wirkung von Lithium liegt in seiner extrapancreatischen Wirkung auf den Glucosestoffwechsel begründet. Lithium vermittelt ähnlich wie Insulin eine verstärkte Aufnahme von Glucose aus dem Blut in die Muskelzellen (Clausen, 1968) und senkt so den Blutzuckerspiegel (Vendsborg und Rafaelsen, 1973; Rosetti, 1989). Es ist also schwierig, die Ergebnisse aus dem Tierversuch auf Menschen zu übertragen, die mit Lithium behandelt werden. Bei chronischer Therapie ändern sich die Plasmakonzentrationen nur langsam, so daß die Effekte auf die Freisetzung von Catecholaminen und die Glucoseaufnahme in periphere Zellen unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Der Einfluß auf den Blutzuckerspiegel hängt davon ab, ob die pankreatische oder die extrapancreatische Wirkung überwiegt.

Auf zellulärer Ebene gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie Lithium in die Signaltransduktion eingreifen kann. Lithium vermittelt seine Wirkung nicht über Rezeptoren, sondern hat seinen Angriffspunkt innerhalb der Zelle. Viele Untersuchungen zum Wirkmechanismus wurden an Hirngewebe oder Blutplättchen durchgeführt. Lithium inaktiviert inhibitorische G-Proteine, so daß der basale cAMP-Spiegel ansteigt (Masana et al., 1992). Dieser Effekt ist in verschiedenen Geweben und Zellsystemen unterschiedlich ausgeprägt (Risby et al., 1991). Neben diesem Einfluß auf das Adenylylcyclasesystem konnte an isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte gezeigt werden, daß Lithium auch mit dem Phospholipase C-System interagiert (Zawalich et al., 1989b). Die Hemmung der Inositolmonophosphatase führt dazu, daß die Zellen an Inositol verarmen, das zur Synthese von *second messenger*-Vorstufen für die Signaltransduktion von Bedeutung ist. Daneben beeinflusst Lithium die Aktivität der Proteinkinase C. Bei akuter Gabe bewirkt Lithium eine Stimulation der Proteinkinase C, während die chronische Anwendung zu einer Abnahme der

Aktivierbarkeit der Proteinkinase C führt (Manji und Lenox, 1994). Die akute Stimulation der Proteinkinase C ruft unter anderem die Freisetzung von Catecholaminen hervor. Ob alle diese Eingriffsmöglichkeiten von Lithium in insulinsezernierenden Zellen genutzt werden und wie groß ihr Beitrag zur Hemmung der Insulinsekretion ist, wurde noch nicht abschließend untersucht.

1.2.4.3 Galanin

Galanin gehört zur Gruppe der pankreatischen Neuropeptide, die die Funktion der Langerhansschen Inseln modulieren.. Ähnlich wie für Inkretinhormone wurden auch für pankreatische peptiderge Neurotransmitter bestimmte Kriterien zu ihrer Definition aufgestellt (Ahrén et al., 1986). Es handelt sich um Peptide, die in den Nerven des Pankreas lokalisiert sind und durch nervale Stimulation im Pankreas freigesetzt werden. Sie beeinflussen unabhängig von den klassischen adrenergen und cholinergen Neurotransmittern die Sekretionsrate der Inselzellhormone. Außerdem soll im pharmakologischen Experiment ihre Wirkung durch spezifische Antagonisten hemmbar sein, und die exogene Gabe des Peptids soll die Wirkung auf die Sekretion der Inselzellhormone nachahmen können.. Anhand dieser Kriterien unterscheiden sich die Neuropeptide durch ihre Lokalisation und den Mechanismus ihrer Freisetzung von den Inkretinhormonen (Kap. 1.2.3). Galanin wurde zusammen mit Noradrenalin in den Vesikeln sympathischer Neurone des Pankreas nachgewiesen, und beide Neurotransmitter werden nach nervaler Stimulation gemeinsam freigesetzt (Dunning et al., 1986; Havel et al., 1992; Yamaguchi, 1992).

Galanin wurde erstmals 1983 aus dem oberen Dünndarm von Schweinen isoliert (Tatemoto et al., 1983). Der Name setzt sich aus den Bezeichnungen der N- und C-terminalen Aminosäuren Glycin und Alanin zusammen. Bei den meisten Säugetieren ist Galanin ein Peptid von 29 Aminosäuren Länge. Beim Menschen besteht es aus 30 Aminosäuren. Das C-terminale Ende unterscheidet sich bei verschiedenen Spezies. Bei Schwein, Schaf und Kuh ist die letzte Aminosäure amidiertes Alanin, bei der Ratte amidiertes Threonin. Im Gegensatz dazu ist beim Menschen anstelle der Amidierung an Threonin als zusätzliche Aminosäure Serin gebunden (Bersani et al., 1991; McKnight et al., 1992).

Galanin und die Galanin-mRNA wurden sowohl in Hirn und Rückenmark, als auch in peripheren Nerven, zum Beispiel des Gastrointestinaltrakts, des kardiovaskulären Systems, der Leber und des Pankreas, nachgewiesen (Ahrén et al., 1991; Shimosegawa et al., 1992). Entsprechend dieser Gewebeverteilung hat Galanin neben seinem Einfluß auf die

Insulinsekretion auch viele extrapancreatische Wirkungen. Es wird mit Demenz vom Alzheimer Typ in Verbindung gebracht, weil es in einigen Hirnregionen die Ausschüttung von Acetylcholin hemmt. Außerdem vermindert es die Freisetzung von Glutamat, senkt die Erregbarkeit von Neuronen im Locus coeruleus und verstärkt die analgetische Wirkung von Morphin (Bartfai et al., 1993). Galanin stimuliert die Sekretion von Wachstumshormon und Prolaktin, so daß es an der Kontrolle von Wachstumsprozessen beteiligt zu sein scheint. Ein weiterer zentraler Effekt ist die Steigerung des Hungergefühls (Lee et al., 1994; Übersicht bei Bedecs et al., 1995). Zu den peripheren Wirkungen zählen die Beeinflussung der Darmmotilität und die Hemmung der Insulinsekretion.

Galanin vermittelt seine Wirkung über die Bindung an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (Übersicht bei Laburthe et al., 1994). Cormont et al. (1991) untersuchten in RINm5F-Zellen mit Hilfe von Antikörpern, welches G-Protein an den Galanin-Rezeptor bindet. Ihre Beobachtungen weisen auf G_{i1} oder G_{i2} hin, zwischen denen der Antikörper nicht unterscheiden kann. Weitere Versuche zeigten, daß der Galanin-Rezeptor verschiedene G-Proteine aktivieren kann. Mittels Immunpräzipitation konnte in RINm5F-Zellen die Interaktion mit G_{i1} , G_{i2} und G_{i3} nachgewiesen werden (Gillison und Sharp, 1994). Davon führen G_{i2} und G_{i3} zur Inhibierung der Adenylylcyclase (McDermott und Sharp, 1995) als einem von vier Mechanismen zur Hemmung der Insulinsekretion (Übersicht bei Lindskog und Ahrén, 1991; McDermott und Sharp, 1993). Der zweite Angriffspunkt ist die Öffnung von K^+ -Kanälen, so daß durch die Hyperpolarisation der Zellmembran der depolarisierenden Wirkung von Glucose entgegengewirkt wird (DeWeille et al., 1988). Außerdem vermindert Galanin den Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle. Ob dies ein direkter, von der Hyperpolarisation unabhängiger Effekt ist, wie Homaidan et al. (1991) an RINm5F-Zellen nachwies, ist umstritten. Neuere Untersuchungen zeigten, daß Galanin einen biphasischen Einfluß auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel ausübt. Erst bewirkt es einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration durch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern; danach folgt eine Absenkung unter das Ausgangsniveau (Fridolf und Ahrén, 1993; Ahrén, 1996 a). Trotz dieser kurzfristigen Erhöhung der Ca^{2+} -Spiegel hemmt Galanin die Insulinsekretion (Lang et al., 1994). Für die Hemmung scheint demnach ein zusätzlicher Mechanismus verantwortlich zu sein. Galanin kann ähnlich wie α_2 -Adrenozeptoragonisten die Insulinsekretion durch direkte Interaktion mit dem Exozytosemechanismus unabhängig vom cAMP-Spiegel und der Ca^{2+} -Konzentration verhindern (Ullrich und Wollheim, 1989; Sharp et al., 1989). Dabei scheint die Stimulierung der Proteinphosphatase Calcineurin eine wichtige Rolle zu spielen, da die Hemmung der

Phosphataseaktivität den Einfluß von Galanin auf die Exocytose verhindert (Renstrom et al., 1996).

1.3 Regulation der Genexpression

Damit eine Zelle sich an veränderte Bedingungen in ihrer Umgebung anpassen kann, muß sie in der Lage sein, ihre Enzym- und Proteinausstattung entsprechend zu ändern. Die Menge eines Proteins kann über Proteinstabilität, Translationskontrolle oder mRNA-Stabilität variiert werden (Abb. 1.8). Der erste und häufig entscheidende Schritt ist aber die Kontrolle der mRNA-Synthese, das heißt der Transkriptionsrate von Genen.

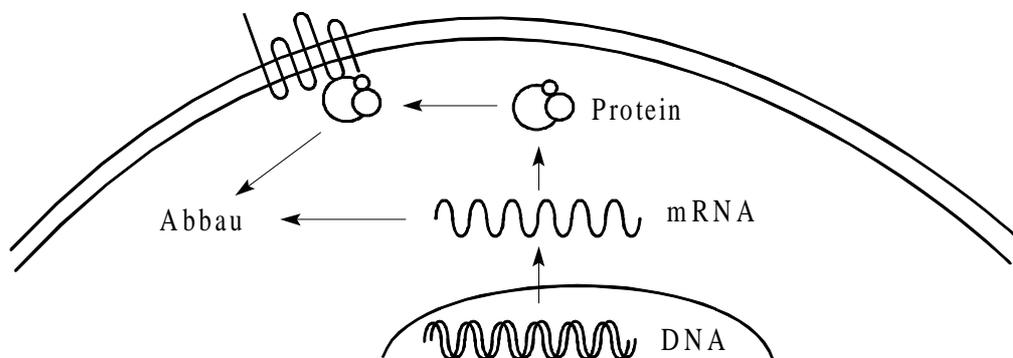


Abb. 1.8 Angriffspunkte zur Regulation der Proteinausstattung einer Zelle

Die Proteinmenge kann anhand von Proteinstabilität, Translationseffizienz, mRNA-Stabilität und Transkriptionsrate verändert werden (modifiziert nach Milligan und Green, 1991).

Die ersten Untersuchungen zur Genregulation befaßten sich mit der Enzyminduktion bei Bakterien. Jacob und Monod (1961) entwickelten daraufhin das Operonmodell. Danach sind Gene Funktionseinheiten, die aus dem für ein Protein kodierenden Abschnitt und einer Kontrollregion, die die gewebespezifische Expression und die Anpassung an einen veränderlichen Bedarf steuern, bestehen. Die Bindung eines Repressors an die Kontrollregion eines Strukturgens verhindert die Transkription dieses Gens. Bei Änderung der Stoffwechsellage löst sich der Repressor von der DNA und die Transkription wird ermöglicht. Für ihre Untersuchungen, die schließlich zur Regulator-Operator-Hypothese führten, erhielten Jacob und Monod 1965 den Nobelpreis für Medizin.

Die beschriebene negative Genregulation, d. h. die Hemmung der Transkription, findet man überwiegend bei Bakterien. In eukaryotischen Zellen wird die Transkriptionsrate über eine

positive Genregulation gesteuert. Auch der Aufbau der Kontrollregion ist in Eukaryoten komplexer. Die Promotorsequenz, die den Initiationsstartpunkt und die Transkriptionsgeschwindigkeit festlegt, liegt wie bei Prokaryoten direkt neben der für ein Protein kodierenden Region. Andere regulatorische Sequenzen, die die Genaktivität verstärken (*enhancer*) oder vermindern (*silencer*), können aber tausende Basenpaare vom Strukturgen entfernt liegen. Bei der positiven Genregulation wird die Transkription durch die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an die Kontrollregion stimuliert. Ohne die Bindung von Aktivatoren besitzt die RNA-Polymerase nur geringe Affinität zu dem Promotor des entsprechenden Gens. Transkriptionsfaktoren können anhand ihrer Spezifität eingeteilt werden. Generelle Faktoren werden für eine geringfügige basale Transkriptionsaktivität aller Gene benötigt. Die spezifischen Transkriptionsfaktoren sind wichtig für die Regulation ganz bestimmter Gene und können deren Transkriptionsrate um ein Vielfaches steigern. Dabei sind sie aber auf die gleichzeitige Anwesenheit der generellen Faktoren angewiesen. Durch das Zusammenwirken verschiedener Transkriptionsfaktoren in der *enhancer*-Region wird spezifisch bei einem oder einigen wenigen Genen die Transkription verstärkt oder erst ermöglicht.

Zur Charakterisierung der *enhancer*-Sequenzen und der an sie bindenden Transkriptionsfaktoren stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Untersuchung der Kontrollregion erfolgt mittels sogenannter Reporter-Gen-Assays (Übersicht bei Bronstein et al., 1994). Dabei wird die Kontrollregion in ein Plasmid eingebaut und statt an ihr eigentliches Strukturgen an ein Reporter-Gen gekoppelt. Oft verwendete Reporter-Gene kodieren für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) oder die Luziferase. Diese Enzyme kommen normalerweise in eukaryotischen Zellen nicht vor und können aufgrund ihrer Aktivität leicht in einem Enzymtest nachgewiesen werden. Wird das Plasmid in Zellen transfektiert, in denen das Strukturgen exprimiert wird, so wird das Reporter-Gen in gleichem Ausmaß transkribiert. Durch den Einbau verkürzter oder mutierter Kontrollregionen kann die genaue Lage der *enhancer* und *silencer* bestimmt werden.

Die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren erfolgt aufgrund ihrer Fähigkeit, an bestimmte DNA-Sequenzen zu binden. Im *footprinting*-Assay wird durch die Bindung des Transkriptionsfaktors dieser Teil des DNA-Strangs vor dem Abbau durch DNase I geschützt, so daß man seine Sequenz ermitteln kann. Beim *electro mobility shift assay* (EMSA) ändert sich aufgrund der Protein-DNA-Interaktion die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld.

1.3.1 cAMP abhängige Genregulation

Hormone können über die Beeinflussung von *second messenger* Systemen die Transkriptionsrate von Genen verändern. Dies geschieht mittels Transkriptionsfaktoren, die durch *second messenger* in ihrer Aktivität reguliert werden. Ein wichtiger *second messenger*, der große Bedeutung für die Genregulation hat, ist cAMP. Entsprechend nennt man die DNA-Sequenzen, die cAMP-abhängig die Transkriptionsrate steigern, *cAMP response element* (CRE). Bei dem Versuch, diese Sequenz zu charakterisieren, fanden Roesler et al. (1988) das aus acht Basenpaaren bestehende Palindrom 5'-TGACGTCA-3'. Der Transkriptionsfaktor, der an das CRE bindet, wird als CREB (*CRE-binding protein*) bezeichnet.

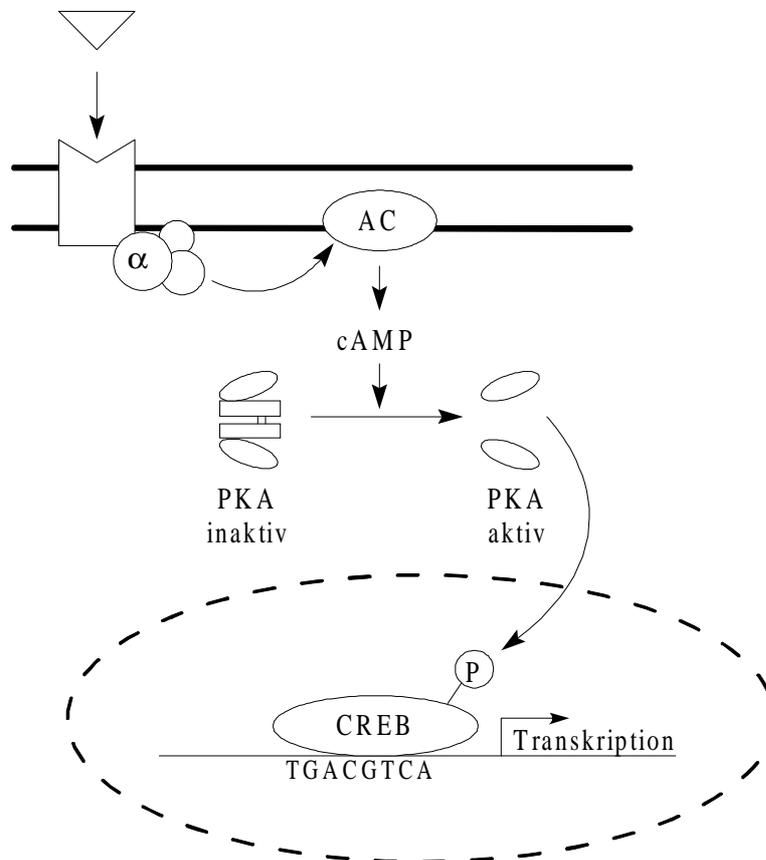


Abb. 1.9 Regulation der Transkription durch CRE

Die Stimulation der Adenylylcyclase (AC) durch einen G_s-gekoppelten Rezeptor führt über die Bildung von cAMP zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Dadurch kommt es zur Translokation der PKA in den Zellkern, wo das CRE-binding protein (CREB) phosphoryliert wird und so eine Erhöhung der Transkriptionsrate vermittelt.

Durch eine Erhöhung der cAMP-Spiegel in der Zelle wird die Proteinkinase A aktiviert (Abb. 1.9). Dabei trennt sich die aktivierte katalytische Untereinheit von der regulatorischen Untereinheit ab und diffundiert in den Zellkern. Dort phosphoryliert sie CREB an Serin 133, wodurch die Transkriptionsrate gesteigert wird (Nigg et al., 1985; Gonzalez et al., 1989). Der genaue Mechanismus, über den die Phosphorylierung die CREB-Aktivität ändert, ist nicht bekannt. Es ist möglich, daß die Konformationsänderung die Interaktion mit anderen basalen Transkriptionsfaktoren ermöglicht und darüber die Transkription aktiviert (Karin, 1992).

Neben CREB sind weitere CRE-Modulatoren (CREM) beschrieben. Während einige Proteine dieser Familie wie CREM τ die Transkriptionsrate steigern, bewirken CREM α , β und χ , daß die Transkription der Zielgene unterdrückt wird. Sie stellen also Repressoren der Gentranskription dar.

Eine weitere DNA-Sequenz, die eine cAMP-abhängige Genregulation ermöglicht, ist die AP-2 Bindungsstelle (Imagawa et al., 1987). Diese Sequenz kann die Transkription nur aktivieren, wenn sie in mehreren Kopien in der Promotorregion vorkommt. Außerdem unterscheidet sie sich vom CRE, weil nicht nur erhöhte cAMP-Spiegel, sondern auch Phorbolster zu einer Aktivierung führen.

1.4 Zielsetzung

Chronische Exposition eines biologischen Systems mit einem Agonisten führt häufig zu einer Verminderung der zellulären Antwort. Ist infolge der Adaptationsprozesse nicht nur die Reaktion auf den verwendeten Agonisten beeinträchtigt, sondern sind auch die Effekte, die über andere Rezeptoren vermittelt werden, betroffen, so spricht man von heterologer Desensitivierung. Eine Ursache für die heterologe Desensitivierung eines Zellsystems können Veränderungen der Menge bestimmter G-Proteine sein. Der Proteingehalt kann über die vorliegende Menge an mRNA gesteuert werden. An Rattenmyokardzellen zeigten Eschenhagen et al. (1991), daß die chronische Gabe von Isoprenalin eine Zunahme der mRNA von inhibitorischen G-Protein- α -Untereinheiten hervorruft. Diese Regulation wird von einer verstärkten Ansprechbarkeit auf Carbachol, einem Agonisten an muskarinischen ACh-Rezeptoren begleitet (Eschenhagen et al., 1992b).

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob an INS-1 Zellen eine heterologe Desensitivierung der Insulinsekretion unter Beteiligung der Regulation der mRNA von G-Protein- α -Untereinheiten stattfindet. Dazu sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Welche G-Protein- α -Untereinheiten sind in INS-1 Zellen vorhanden?
2. Hat die chronische Inkubation von INS-1 Zellen mit Adrenalin einen Einfluß auf den Gehalt an α_s - und α_{i2} -mRNA? Nachfolgend wurde der zeitliche Verlauf der Regulation bestimmt und der Rezeptor identifiziert, über den der Effekt vermittelt wird.
3. Bewirken andere Hormone, die die Insulinsekretion hemmen oder stimulieren, ebenfalls eine Regulation der α_s - und α_{i2} -mRNA?
4. Ist der Einfluß auf den Gehalt an α_s - und α_{i2} -mRNA abhängig von der Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors oder bewirkt eine Substanz, die nicht über G-Protein gekoppelte Rezeptoren wirkt, auch eine Regulation der α_s - und α_{i2} -mRNA?
5. Ist die Regulation der α_s - und α_{i2} -mRNA abhängig von einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle?
6. Ändert sich parallel zur Regulation der α_s - und α_{i2} -mRNA die Wirkung der untersuchten Substanzen auf die Insulinsekretion?
7. Wird parallel zur Regulation der α_s - und α_{i2} -mRNA auch die Glucose-induzierte Insulinsekretion beeinflusst?

2 MATERIAL

2.1 Zelllinie INS-1

Die in dieser Arbeit eingesetzte Zelllinie INS-1 stammt von einem Ratteninsulinom ab und wurde von Asfari et al. (1992) etabliert. Die Zellen werden in Zellkulturflaschen von 75 cm² Wachstumsfläche in 20 ml Komplettmedium bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung unter sterilen Bedingungen als Monolayer kultiviert. Einmal wöchentlich erfolgt die Passagierung und am fünften Tag jeder Passage wird das Komplettmedium erneuert. Am fünften Tag können die Zellen für Versuche eingesetzt werden.

2.2 Bakterienstamm und Plasmidvektoren

Die cDNAs für G α _s, G α _{i1}, G α _{i2}, G α _{i3} und G α _o wurden von Jones und Reed (1987) aus olfaktorischem Neuroepithel der Ratte gewonnen und in das Plasmid pGEM-2 eingefügt. Das Plasmid hat eine Größe von 2869 bp. Die Inserts befinden sich innerhalb der *multi-cloning site* in der EcoRI-Schnittstelle. Eine für die β -Lactamase kodierende Region (Amp^r) verleiht den Bakterien, die mit pGEM-2 transfektiert werden, Ampicillinresistenz.

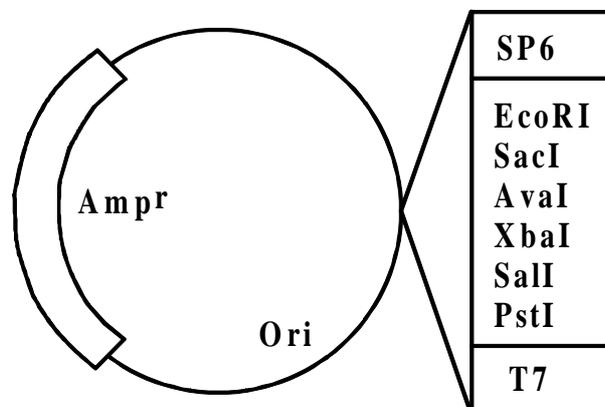


Abb. 2.1 Vereinfachte Restriktionskarte des Plasmids pGEM-2

SP6 und T7 bezeichnen die Startpunkte für die gleichnamigen RNA-Polymerasen. Ori stellt den Replikationsstartpunkt des Plasmids dar. Die Amp^r-Region kodiert für die β -Lactamase.

Als Wirtszelle für den Vektor pGEM-2 wird das Darmbakterium *Escherichia coli* verwendet. Der eingesetzte, sichere *E. coli*-Stamm DH5 α ist nicht zur Rekombination fähig und weist eine hohe Transfektionseffizienz auf.

2.3 Geräte

Blotapparatur TurboBlotter™	Schleicher & Schuell, Dassel
Elektrophoresekammer	Eigenherstellung der Institutswerkstatt
Filterpapier GB 003	Schleicher & Schuell, Dassel
FLUO-Link FLX	MWG Biotech, Ebersberg
Gamma-Counter LB 2111	Berthold, Wildbad
Hybridisierungssofen OV 1	Biometra, Göttingen
Laserdensitometer UltraScan® XL mit Software GelScan® XL	LKB-Pharmacia, Freiburg
Nylonmembran Nytran® 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen:	
Polybutadienstyrol, 15 ml	Nunc, Wiesbaden
Polypropylen, 50 ml	Nunc, Wiesbaden
Polystyrol, 5 ml	Waldeck Laborbedarf, Münster
Röntgenfilm Hyperfilm®-ECL	Amersham Buchler, Braunschweig
Spannungsquelle	Biorad, München
UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UV-Photometer UV 160A	Shimadzu, Duisburg
Vortex Genie 2™	Bader & Hobein, Zürich/Schweiz
Zellkulturgefäße:	
Kulturflaschen	Falcon, Heidelberg
Multiwells	Nunc, Wiesbaden

Weitere hier nicht aufgeführte Geräte entsprechen der üblichen Laborausstattung.

2.4 Chemikalien, Kits und Enzyme

Agar	Sigma Chemie, Deisenhofen
Agarose, DNA-Grad	Biomol, Hamburg
Ampicillin	Sigma Chemie, Deisenhofen
Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat	Boehringer Mannheim
Anti-Meerschweinchen-IgG (Ziege)	Linco Research Inc., St. Louis/USA
Anti-Ratteninsulin-IgG	Linco Research Inc., St. Louis/USA
Blockierungsreagenz	Boehringer Mannheim
Carrier-IgG vom Meerschweinchen	Linco Research Inc., St. Louis/USA
Caseinhydrolysat	Sigma Chemie, Deisenhofen
<i>DIG Luminescent Detection Kit</i>	Boehringer Mannheim
<i>DIG DNA Labeling Kit</i>	Boehringer Mannheim
Dimethylpyrocarbonat (DMDC)	Fluka Biochemika, Buchs/Schweiz

Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1.3,7]decan}-4-yl)phenyl-phosphat (CSPD®)	Boehringer Mannheim
Galanin, human	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
GIP(1-42), vom Schwein	Saxon Biochemicals, Hannover
GLP-1(7-36)amid, human	Saxon Biochemicals, Hannover
Glucose	J.T. Baker B.V., Deventer/Niederlande
Guanidiniumisothiocyanat	Fluka Biochemika, Buchs/Schweiz
¹²⁵ I-Insulin vom Schwein	Hoechst, Frankfurt
Mineralöl	Sigma Chemie, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka Biochemika, Buchs/Schweiz
<i>Oligotex</i> TM mRNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden
<i>PCR Core Kit</i>	Boehringer Mannheim
<i>PCR-primer</i>	Eurogentec, Seraing, Belgien
<i>QIAEX</i> TM Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
<i>QIAGEN</i> [®] Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
Ratteninsulinstandard	Novo Nordisk, Bagsvaerd/Dänemark
Restriktionsenzyme	Boehringer Mannheim
Rinderserumalbumin, Fraktion V (BSA)	Biomol, Hamburg
Roentofix (Fixierer)	Tetenal, Norderstedt
Roentogen (Entwickler)	Tetenal, Norderstedt
Sarcosyl	Fluka Biochemika, Buchs/Schweiz
<i>1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR</i>	Boehringer Mannheim
UK 14.304	Pfizer, UK
Verapamil	Fluka Biochemika, Buchs/Schweiz

Gebräuchliche Chemikalien sind nicht weiter aufgeführt. Sie werden grundsätzlich in p. a. Qualität benutzt.

2.5 Lösungen

Alle Lösungen werden mit destilliertem Wasser hergestellt und vor der Verwendung autoklaviert. Sofern nichts anderes angegeben ist, werden die Lösungen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.5.1 Lösungen für die Transformation von *E. coli*

CaCl ₂ -Lösung, pH 7	CaCl ₂	60 mmol/l
	PIPES	10 mmol/l
	Glycerin	15 %

2.5.2 Lösungen für die Anzucht der E. coli

LB-Medium mit Ampicillin

Beim LB-Medium nach Luria Bertani handelt es sich um ein komplexes oder undefiniertes Medium. Die genaue Zusammensetzung ist unbekannt, da seine Bestandteile selbst komplexe Mischungen sind. Trypton liefert im wesentlichen Aminosäuren und kleine Peptide. Hefeextrakt enthält Stickstoff, Zucker sowie organische und anorganische Nährstoffe. Zusätzlich wird Natriumchlorid zugegeben.

LB-Broth Base (Sigma) ist ein fertiges Gemisch von Caseinhydrolysat, Hefeextrakt und Natriumchlorid im Verhältnis 2:1:1.

LB-Broth Base (Sigma) 2,5 % mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt
 Ampicillin wird in einer Endkonzentration von 50 µg/ml nach dem Autoklavieren zugegeben, da es hitzeempfindlich ist.

LB-Agar mit Ampicillin
 LB-Broth Base 3 %
 (auf pH 7,4 eingestellt)
 Agar 1,5 %
 Ampicillin wird in einer Endkonzentration von 50 µg/ml nach dem Autoklavieren zugesetzt und der LB-Agar in Petrischalen ausgegossen.

Ampicillin-Stammlösung
 Ampicillin 1mg/ml aliquotiert zu 1 ml
 Lagerung bei -20 °C

Glycerolhaltige Bakterienstammkultur LB-Medium mit 40 % Glycerol

2.5.3 Lösungen für die Plasmidisolierung

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)
 RNase A 100 µg/ml
 TRIS/HCl 50 mmol/l
 EDTA 10 mmol/l
 pH 8,0; Lagerung bei 4 °C

Puffer P2 (Lysepuffer)
 NaOH 200 mmol/l
 SDS 1 %

Puffer P3 (Neutralisationspuffer)
 K-Acetat 3,0 mol/l
 pH 5,5; Lagerung bei 4 °C

Puffer QBT (Equilibrierungspuffer)	NaCl	750 mmol/l
	MOPS	50 mmol/l
	Ethanol	15 %
	TritonX-100	0,15 %
	pH 7,0	
Puffer QC (Waschpuffer)	NaCl	1,0 mol/l
	MOPS	50 mmol/l
	Ethanol	15 %
	pH 7,0	
	Puffer QF (Elutionspuffer)	NaCl
TRIS/HCl		50 mmol/l
Ethanol		15 %
pH 8,5		

2.5.4 Lösungen für die Gewinnung spezifischer DNA-Fragmente

TAE-Puffer	TRIS-Acetat	40 mmol/l
	EDTA	1 mmol/l
	pH 7,6	
RE-Inkubationspuffer H	TRIS-HCl	50 mmol/l
	NaCl	100 mmol/l
	MgCl ₂	10 mmol/l
	DTT	1 mmol/l
	pH 7,5 (bei 37 °C)	
RE-Inkubationspuffer B	TRIS-HCl	10 mmol/l
	NaCl	100 mmol/l
	MgCl ₂	5 mmol/l
	2-Mercaptoethanol	1 mmol/l
	pH 8,0 (bei 37 °C)	

2.5.5 Lösungen für die DNA-Markierung

Hexanukleotid-Mix 10x	Statistische Mischung von Hexanukleotiden als Primer für die Strangverlängerung in:	
	TRIS-HCl	500 mmol/l
	MgCl ₂	100 mmol/l
	DTT	1 mmol/l
	BSA	2 mg/ml
	pH 7,2; Lagerung bei -20 °C	

dNTP-Gemisch	dATP, dCTP, dGTP	jeweils 1 mmol/l
	dTTP	0,65 mmol/l
	DIG-11-dUTP	0,35 mmol/l
	Lagerung bei -20 °C	
EDTA-Lösung	0,2 mol/l, pH 8,0	
Na-acetat-Lösung	3 mol/l, pH 5,5	
TE-Puffer, pH 8,0	TRIS-HCl	10 mmol/l
	EDTA	1 mmol/l

2.5.6 Lösungen für die RNA-Isolierung

Lösung D	Guanidiniumthiocyanat	4 mol/l
	Na-citrat, pH 7	25 mmol/l
	Sarcosyl (30 %)	0,5 %
	2-Mercaptoethanol	0,1 mol/l
	DMDC	0,1 %
ss-Phenol	Phenol	22,7 g
	TRIS, 2 M, pH 7,4	5 ml
	Aqua bidest.	6,5 ml
	über Nacht lösen und am nächsten Morgen die wässrige Phase abnehmen	
	TRIS, 2 M, pH 7,4	5 ml
	m-Cresol	1,25 ml
	Mercaptoethanol	50 µl
	8-OH-Chinolin	25 mg
	bei 4 °C vier Wochen haltbar	
Na-acetat-Lösung, pH 4,0	Na-acetat	2 mol/l
	DMDC	0,1 %
Chloroform/Isoamylalkohol	24+1	

2.5.7 Lösungen für Gelelektrophorese und Northern Blot

Agarosegel, 1 %	Agarose (DNA-Grad)	1 %
	MOPS	10 %
	Formaldehyd	2,2 mol/l
	DMDC	0,1 %

MOPS (10x)	3-(N-morpholino-)propansulfonsre.0,2 mol/l
	Na-acetat 0,05 mol/l
	EDTA 0,01 mol/l
	pH 7
Ethidiumbromid-Stammlösung	Ethidiumbromid 10 mg/ml
Farbmischung	EDTA 372 mg
	Bromphenolblau 125 mg
	Xylencyanol 125 mg
	Glycerin (anhydr.) 25,0
	Wasser (DMDC) 25,0
Elektrophoresepuffer	MOPS 1x
Alkalischer Transferpuffer	NaCl 3 mol/l
	NaOH 8 mmol/l

2.5.8 Lösungen für die Hybridisierung

DNA-Prähybridisierungspuffer	(high-SDS-Puffer):
	Formamid 50 %
	SSC 5x
	Na-phosphat, pH 7 50 mmol/l
	Blocking Reagenz 2 %
	N-Lauroylsarcosin 0,1 %
	SDS 7 %
	Lagerung bei -20 °C
	Vor der Wiederverwendung wird die Lösung für 10 min auf 68 °C erwärmt.
DNA-Hybridisierungspuffer	Prähybridisierungspuffer mit DIG-markierter DNA
	Lagerung bei -20 °C
	Vor der Wiederverwendung wird die Lösung für 10 min auf 68 °C erwärmt.
SDS-Stammlösung	SDS 10 %
Waschlösungen	SSC 2x, 0,1 % DMDC
	SSC 0,1x, 0,1 % DMDC mit 0,1 % SDS
SSC (2x)	NaCl 300 mmol/l
	Na ₃ citrat 30 mmol/l
	pH 7

RNA-Prähybridisierungspuffer	Formamid	50 %
	SSC	5x
	Blocking Reagenz	2 %
	N-Lauroylsarcosin	0,1 %
	SDS	0,2 %
	Lagerung bei -20 °C Vor der Wiederverwendung wird die Lösung für 10 min auf 68 °C erwärmt.	
RNA-Hybridisierungspuffer	Prähybridisierungspuffer mit DIG-markierter RNA Lagerung bei -20 °C Vor der Wiederverwendung wird die Lösung für 10 min auf 68 °C erwärmt.	

2.5.9 Lösungen für die Detektion

Blocking Reagenz-Stammlösung	Blocking Reagenz 10 % in Puffer 1 Lagerung bei 4 °C	
Puffer 1	Maleinsäure	0,1 mol/l
	NaCl	0,15 mol/l
	pH 7,5	
Puffer 2	Blocking Reagenz-Stammlösung	1 Teil
	Puffer 1	9 Teile
Puffer 3	Tris-HCl, pH 9,5	100 mmol/l
	NaCl	100 mmol/l
	MgCl ₂	50 mmol/l
Anti-DIG-AP-Konjugat-Lösung	polyklonales Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment vom Schaf, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (75 U/ml) Stammlösung bei 4 °C aufbewahren Verdünnung 1:10.000 in Puffer 2	
CSPD-Lösung	CSPD wird 1:100 in Puffer 3 verdünnt Lagerung bei 4 °C im Dunkeln	

2.5.10 Lösungen für die reverse Transkription

Reaktionspuffer 10x	TRIS	100 mmol/l
	KCl	500 mmol/l
	pH 8,3	

MgCl ₂ -Lösung	25 mmol/l
Deoxynukleotidmix	jeweils 10 mmol/l dATP, dCTP, dTTP, dGTP

2.5.11 Lösungen für die PCR

PCR-Puffer 10x	TRIS-HCl	100 mmol/l
	MgCl ₂	15 mmol/l
	KCl	500 mmol/l
	pH 8,3 (bei 20 °C)	
dNTP-Stammlösung	jeweils 10 mmol/l dATP, dCTP, dTTP, dGTP pH 7,0	

2.5.12 Lösungen für die Southern Technik

Denaturierungspuffer	NaOH	0,5 mol/l
	NaCl	1,5 mol/l
Neutralisationspuffer	TRIS-HCl	1 mol/l
	NaCl	1,5 mol/l

2.5.13 Lösungen für Insulinsekretionsversuche

Krebs-Ringer-Hepes-Puffer	NaCl	118,4 mmol/l
	KCl	4,84 mmol/l
	KH ₂ PO ₄	1,19 mmol/l
	MgSO ₄	1,19 mmol/l
	CaCl ₂	2,54 mmol/l
	HEPES	10,0 mmol/l

Diese Lösung wird am Versuchstag frisch hergestellt, und nach Zusatz von 0,5 % BSA auf pH 7,4 eingestellt.

Waschpuffer	NaCl	154,0 mmol/l
	Na ₂ HPO ₄	46,0 mmol/l
	KH ₂ PO ₄	4,8 mmol/l
	EDTA	31,7 mmol/l
	Thiomersal	0,01 % (m/V)

pH 7,4; Lagerung bei 4 °C

RIA-Puffer	Waschpuffer mit 1 % BSA pH 7,4	
------------	-----------------------------------	--

Isotopenpuffer	KRH-Puffer mit 0,1 % Natriumazid und 0,5 % BSA pH 7,4
Anti-Ratten-IgG	in 2 ml RIA-Puffer gelöst; am Versuchstag mit RIA-Puffer 100fach verdünnt Lagerung bei -20 °C
Anti-Meerschweinchen-IgG und Carrier-IgG	in Waschpuffer unter Zusatz von 3 % PEG 6000 gelöst Lagerung bei -20 °C
Ratteninsulinstandard	in Waschpuffer unter Zusatz von 10 % BSA gelöst Lagerung in Aliquots von 20 µl bei -20 °C
¹²⁵ I-Insulin	in 1,2 ml Isotopenpuffer gelöst; am Versuchstag 200fach verdünnt eingesetzt Lagerung bei -20 °C

2.5.14 Stammlösungen für die Inkubationen

Adrenalin	$5 \cdot 10^{-3}$ mol/l
Galanin	$5 \cdot 10^{-5}$ mol/l
GIP und GLP-1	10^{-4} mol/l
Isoprenalin	$2 \cdot 10^{-3}$ mol/l
Lithium	10^{-2} mol/l
UK 14.304	10^{-3} mol/l
Verapamil	10^{-3} mol/l

Vor dem Versuch werden die Stammlösungen mit Komplettmedium auf die einzusetzende Konzentration eingestellt. Für die 90 min Stimulation bei den Sekretionsversuchen wird anstelle des Komplettmediums KRH-Puffer mit einer Endkonzentration von 8,3 mmol/l Glucose verwendet.

3 METHODEN

3.1 Herstellung selektiver Sonden

3.1.1 Transformation von *E. coli*

Transformation bedeutet die Aufnahme von DNA-Molekülen in eine Zelle. Viele Bakterien können DNA-Moleküle aus dem Kulturmedium aufnehmen. Diese DNA-Moleküle werden aber oft in der Zelle abgebaut. Handelt es sich dagegen um ein Plasmid, dessen Replikationsstartpunkt von der Wirtszelle erkannt wird, besteht die Möglichkeit, daß es im Bakterium verbleibt und dort repliziert wird.

Die meisten Bakterienarten, darunter auch *E. coli*, nehmen DNA unter normalen Bedingungen nur in begrenztem Umfang auf. Um solche Arten wirksam transformieren zu können, muß man durch chemische und physikalische Behandlung der Zellen ihre Bereitschaft, DNA-Moleküle aufzunehmen, erhöhen. Bakterien, die einer solchen Behandlung unterzogen wurden, bezeichnet man als kompetent.

Die Methode basiert auf der Beobachtung von Mandel und Higa (1970), daß Bakterien, die in einer eisgekühlten Calciumchloridlösung inkubiert und anschließend kurz erwärmt werden, DNA des Bakteriophagen λ aufnehmen. Auf die gleiche Weise gelang Cohen et al. (1972) die Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA und Oishi und Cosloy (1972) die Transformation von *E. coli* mit chromosomaler DNA. Dagert und Ehrlich (1979) zeigten, daß die Effizienz der Transformation um das Vier- bis Sechsfache ansteigt, wenn man die Zellen 12 bis 24 Stunden bei 4 °C in der Calciumchloridlösung aufbewahrt.

Arbeitsvorschrift

E. coli werden in LB-Medium bei 37 °C inkubiert, bis eine OD von 0,375 erreicht ist. Gemessen wird bei einer Wellenlänge von 590 nm. 50 ml der Bakteriensuspension werden in ein vorgekühltes Falcontube überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Man zentrifugiert 7 min bei 4 °C und 6000xg und dekantiert den Überstand ab. Das Pellet wird in 10 ml CaCl₂-Lösung suspendiert, erneut bei 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 10 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis gestellt. Danach wird der Ansatz 5 min bei 6000xg und 4 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 2 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen. Um die Transformationseffizienz zu steigern, wird die

Bakteriensuspension über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag aliquotiert man 250 µl in sterile Gefäße und bewahrt diese bei -70 °C auf.

Man vermutet, daß durch das Calciumchlorid die DNA an der Außenseite der Zellen ausfällt oder aufgrund einer Veränderung der Zellwand eine bessere Anheftung der DNA an die Zelle bewirkt wird. Der Hitzeschock veranlaßt die Aufnahme der DNA in die Zelle. Auf diese Weise erhält man ungefähr 10^7 transformierte Bakterien pro µg Plasmid-DNA.

Arbeitsvorschrift

20-50 ng des Plasmids werden mit Aqua bidest. auf 10 µl aufgefüllt. Man gibt 100 µl kompetenter E. coli dazu und inkubiert 10 min auf Eis. Die Bakteriensuspension wird 2 min auf 42 °C erwärmt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (ohne Ampicillin) wird eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die transfektierten Bakterien können bei -70 °C eingefroren werden.

Mit Hilfe eines selektierbaren Markers, der in dem Plasmid enthalten ist, führt man eine Auslese der transformierten Zellen durch. Als Marker werden häufig Antibiotikaresistenzen verwendet. Das Plasmid pGEM-2 verleiht dem Bakterium Ampicillinresistenz (Kap. 2.2). Im Anschluß an die Transformation werden die Bakterien erst für kurze Zeit in einem antibiotikafreien Medium inkubiert, denn die Plasmidgene müssen in der Zelle erst exprimiert werden, um die Antibiotikaresistenz zu entwickeln. Dann werden die Zellen auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert, auf dem nur die erfolgreich transformierten Bakterien wachsen können.

3.1.2 Aufzucht der E. coli

Da die Anzucht von Bakterien für die Plasmidisolierung aus einer Kolonie erfolgen soll, werden die E. coli der Flüssigstammkulturen mit einer sterilen Impföse auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte vereinzelt. Die Kulturen werden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wird eine einzelne Kolonie in 10 ml LB-Amp-Medium überführt. In LB-Medium, das bei 37 °C gehalten und auf einem Schüttler bei 180 Umdrehungen pro Minute durchlüftet wird, teilen sich E. coli-Zellen ungefähr alle 20 Minuten, bis die Kultur ihre maximale Dichte von 2 bis 3×10^9 Zellen je Milliliter erreicht hat. Mit 1 ml Bakteriensuspension aus dieser Über-Tag-Kultur werden 300 ml LB-Amp-Medium angeimpft. Dieser Ansatz wird über Nacht bei 37 °C in Schikanekolben auf dem Schüttler inkubiert und kann am nächsten Morgen geerntet werden.

3.1.3 Isolierung der Plasmide

Die Plasmide werden mit Hilfe des Qiagen Plasmid Kits isoliert. Die Isolierung beruht auf der Methode nach Birnboim und Doly (1979), bei der die Lyse der Bakterien unter alkalischen Bedingungen mit NaOH und SDS durchgeführt wird. Die anschließende Reinigung mittels Phenolextraktion wird durch eine chromatographische Aufreinigung der Plasmid-DNA ersetzt.

Die Isolierung von Plasmiden findet in drei Schritten statt. Durch Zerstören von Zellwand und Zellmembran wird ein Zellextrakt hergestellt. Die Plasmid-DNA wird von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt und schließlich gereinigt.

Zur Lyse der Zellen werden EDTA und SDS verwendet. EDTA komplexiert die für die Aufrechterhaltung der Gesamtstruktur der Bakterienhülle unentbehrlichen Magnesiumionen. Außerdem hemmt es DNA-abbauende Enzyme. Detergentien wie SDS unterstützen die Zellyse, weil sie durch Angriff an den Lipidmolekülen zum Zerreißen der Zellmembran führen.

Um die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA zu trennen, bedient man sich der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der beiden DNA-Moleküle. In alkalischem Milieu ist eine Trennung aufgrund der Konformation möglich. Die meisten Plasmide liegen in der Zelle nicht in der ringförmigen Konformation vor, sondern als überspiralisierte Moleküle (supercoils). Stellt man den pH-Wert des Zellextraktes durch NaOH auf einen Wert zwischen 12,0 und 12,5 ein, wird die nicht überspiralisierte DNA denaturiert. Die Wasserstoffbrücken zwischen den Basen werden aufgebrochen, die Doppelhelix entwindet sich und die Polynukleotidstränge trennen sich auf. Die überspiralisierten Plasmide hingegen bleiben intakt.

Neutralisiert man den Zellextrakt mit Kaliumacetatpuffer, lagern sich die denaturierten Stränge der chromosomalen DNA zusammen und lassen sich durch Zentrifugieren entfernen. Auch die Proteine, die einen SDS-Kaliumacetat-Proteinkomplex bilden, die übrigen Zellbestandteile und SDS können abzentrifugiert werden. Die Plasmid-DNA wird bei neutralem pH-Wert vollständig renaturiert und verbleibt nach dem Zentrifugieren im Überstand. RNase, die zu Beginn zugesetzt wird, zerstört die Bakterien-RNA.

Die Reinigung der Plasmide erfolgt chromatographisch. Der Qiagen Plasmid Kit enthält Säulen, die mit Silikatkugeln von durchschnittlich 100 µm Größe gefüllt sind. An die Silikatgruppen ist als Anionenaustauscher die Diethylaminoethylgruppe gekoppelt, die

Nukleinsäuren in Abhängigkeit von pH-Wert und Salzkonzentration bindet. Die Plasmid-DNA bleibt auf der Säule, während die denaturierte RNA und verbleibende Proteine mit einem Natriumchloridpuffer (1 mol/l) ausgewaschen werden. Die Elution der Plasmid-DNA wird mit 1,25 mol/l NaCl-Puffer durchgeführt. Durch Fällung der DNA mit Isopropanol werden Salzurückstände entfernt und nach Lösen in TE-Puffer können die gereinigten Plasmide bei -20 °C gelagert werden.

Arbeitsvorschrift

Die Bakterien werden aus der in Kap. 3.1.2 beschriebenen Suspensionskultur durch Zentrifugieren für 15 min bei 6000xg, 4 °C geerntet und der Überstand wird verworfen. Das Bakterienpellet wird in 10 ml Puffer P1 suspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 wird vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Man gibt 10 ml auf 4 °C vorgekühlten Puffer P3 dazu, mischt vorsichtig und inkubiert 20 min bei 4 °C. Die Suspension wird 30 min bei 30000xg und 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert und der Überstand sofort abgenommen. Ist er nicht klar, sollte der Überstand erneut 15 min zentrifugiert werden. Ein Quiagen-tip wird mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert und der klare Überstand wird auf die Säule gegeben. Die Säule wird zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen. Dann wird die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF von der Säule eluiert. Die DNA wird mit 0,7 Teilen Isopropanol durch Zentrifugieren für 30 min bei 15000xg und 4 °C gefällt und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wird mit 5 ml kaltem 70 %igen Ethanol gewaschen, zentrifugiert, der Ethanol dekantiert und das Pellet für 5 min an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wird in 500 µl TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.1.4 Gewinnung spezifischer DNA-Fragmente

Die cDNAs für $G\alpha_s$, $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_o$ wurden von Jones und Reed (1987) aus olfaktorischem Neuroepithel der Ratte gewonnen und in das Plasmid pGEM-2 eingefügt. Die α -Untereinheiten der G-Proteine weisen eine hohe Sequenzhomologie auf. Besonders schwierig ist die Unterscheidung zwischen $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i3}$, weil die Nukleotidhomologie der codierenden Regionen 94 % beträgt. Deshalb werden cDNAs zum Nachweis der mRNA von $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_o$ nicht aus der gesamten in das Plasmid eingefügten DNA gewonnen, sondern aus den Fragmenten, die ein spezifisches Erkennen ermöglichen. Man verwendet von der $G\alpha_{i1}$ -cDNA das 600 bp XbaI/EcoRI-Fragment des 3'-Endes, von der $G\alpha_{i3}$ -cDNA das 625 bp EcoRV/EcoRI-Fragment des 3'-Endes und von der $G\alpha_o$ -cDNA das 600 bp

EcoRV/EcoRI-Fragment des 5'-Endes. Es handelt sich jeweils um nicht codierende Sequenzen. Von $G\alpha_s$ und $G\alpha_{i2}$ wird das gesamte cDNA-Insert verwendet. Zur Gewinnung der DNA-Fragmente muß durch die Restriktionsendonuklease EcoRI die eingefügte cDNA aus dem Plasmid herausgeschnitten werden. Dies geschieht durch Inkubieren für 90 Minuten bei 37 °C. Durch Erhitzen auf 68 °C für 10 Minuten wird das Restriktionsenzym inaktiviert. Dann erfolgt ein zweiter Schnitt bei $G\alpha_{i1}$ mit XbaI, bei $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_o$ mit EcoRV. Für die Restriktionsschnitte von $G\alpha_s$ -, $G\alpha_{i1}$ - und $G\alpha_{i2}$ -cDNA wird der RE-Puffer H verwendet, für $G\alpha_{i3}$ - und $G\alpha_o$ -cDNA der RE-Puffer B. Dadurch wird gewährleistet, daß bei den Doppelschnitten beide Restriktionsenzyme eine 100 %ige Aktivität erreichen.

Arbeitsvorschrift

10 µl Plasmidlösung, 5 µl Restriktionspuffer, Aqua bidest. (ad 50 µl) und 10 U Restriktionsenzym werden 90 min bei 37 °C inkubiert. Durch Erhitzen auf 68 °C für 10 Minuten wird das Restriktionsenzym inaktiviert. Nach Zugabe von 10 U des zweiten Restriktionsenzymes wird 60 min bei 37 °C inkubiert.

cDNA	Restriktionspuffer	Restriktionsenzym	Fragmente (bp)
$G\alpha_s$	H	EcoRI	2869, 1120
$G\alpha_{i1}$	H	EcoRI + XbaI	2835, 1345, 600 , 34
$G\alpha_{i2}$	H	EcoRI	2869, 1720
$G\alpha_{i3}$	B	EcoRI + EcoRV	2869, 2445, 625
$G\alpha_o$	B	EcoRI + EcoRV	2869, 1460, 600

Tab. 3.1 Restriktionsschnitte der cDNAs von G-Protein- α -Untereinheiten

Die fett gedruckten Fragmente dienen zur Herstellung der DIG-markierten Sonden für die Northern Blot Technik. Das 2869 bp Fragment ist der Vektor pGEM-2.

Für die Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden zum Nachweis der PCR-Produkte (Kap. 3.3.3) und als Positivkontrolle in der PCR (Kap. 3.3.2) dient die Gesamt-cDNA von α_{i1} und α_o .

Durch Gelelektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel mit TAE-Puffer werden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Ein Zusatz von Ethidiumbromid zum Agarosegel ermöglicht das Erkennen der DNA-Banden unter UV-Licht. Die benötigten DNA-Fragmente

werden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem Qiaex Gel Extraction Kit aus dem Agarosegel zurückgewonnen.

Durch Inkubieren in Natriumperchlorat-haltigem Puffer bei 50 °C werden die Wasserstoffbrücken zwischen den Zuckern im Agarosepolymer aufgebrochen, so daß sich die Agarosegelstücke auflösen. Die dadurch freigesetzten DNA-Fragmente binden an Silikagelpartikel. Diese Adsorption wird durch chaotrope Reagenzien wie Perchlorat verstärkt. Durch wiederholtes Waschen wird die Agarose entfernt. Die Elution erfolgt mit 1 mmol/l Tris-Puffer bei pH 8-8,5. In niedrigkonzentrierten Lösungen bei einem pH-Wert über 7,5 kann keine Adsorption an die Silikagelpartikel mehr stattfinden und die DNA-Fragmente lösen sich im Puffer. Sie können dann bei -20 °C gelagert werden.

Arbeitsvorschrift

Mit einem scharfen, sauberen Skalpell wird das Gelstück, das die DNA-Bande enthält ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Gelstück wird mit 300 µl Puffer QX1 pro 100 mg Gel und 2 µl Qiaex-Suspension pro µg DNA gemischt und 10 min bei 50 °C inkubiert. Während dieser Zeit wird der Ansatz alle 2 min gevortext. Die Suspension wird 30 s bei 12000xg zentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Das Pellet wird erst zweimal mit je 500 µl Puffer QX2 und danach zweimal mit je 500 µl Puffer QX3 gewaschen. Danach läßt man das Pellet 10-15 min an der Luft trocknen. Die DNA wird durch Inkubation für 5 min in TE-Puffer bei Raumtemperatur eluiert, wobei der Ansatz alle 2 min gevortext wird. Die DNA wird bei -20 °C eingefroren.

3.1.5 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA durch random-priming

Um DNA zu markieren, baut man in die Moleküle entweder Nukleotide ein, die das radioaktive Phosphorisotop ^{32}P enthalten, oder man verwendet Nukleotide, an die Substanzen gekoppelt sind, die mittels Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden können. Es sind verschiedene Methoden entwickelt worden, DNA-Stränge zu markieren. Am verbreitetsten sind die Nick-Translation, das Auffüllen von Enden und die Markierung mit Hilfe von Zufalls-*primern*. Besonders mit dem letztgenannten Verfahren erreicht man einen hohen Markierungsgrad.

Durch Erhitzen wird die DNA in Einzelstränge aufgespalten, an die sich Oligonukleotide mit Zufallssequenzen als *primer* anlagern. Das Klenow-Fragment der E. coli DNA-Polymerase I

synthetisiert ausgehend von dem *primer* den Komplementärstrang, der durch Einbau von Digoxigenin-11-Desoxyuridinphosphat markiert ist. Digoxigenin (DIG) ist ein Steroid-Hapten. Für die Markierung von DNA ist Digoxigenin über eine Alkali-labile Esterbindung an dUTP gekoppelt.

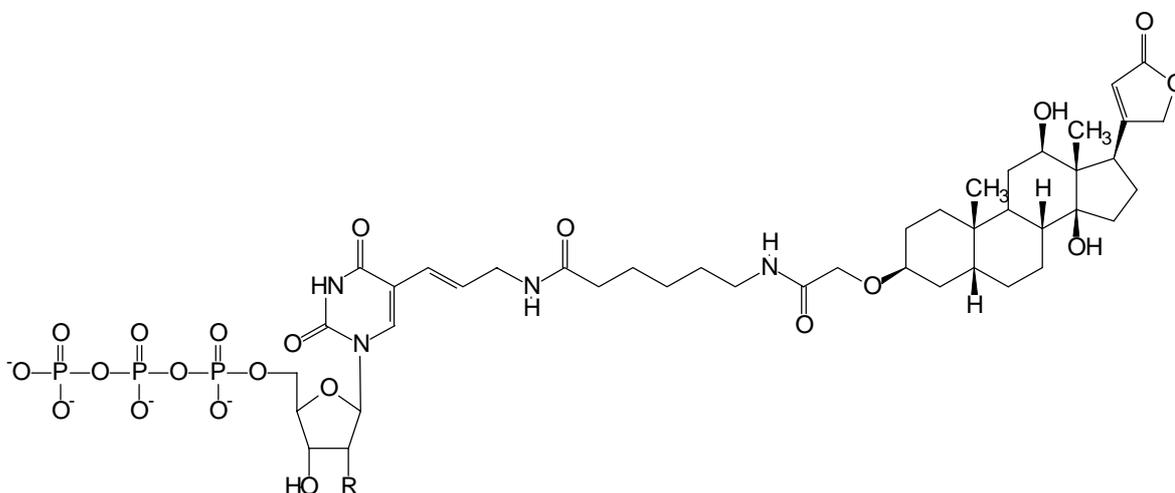


Abb. 3.1 Formel von DIG-dUTP ($R = -H$) bzw. DIG-UTP ($R = -OH$)

Die Markierung mit DIG-11-dUTP anstelle des sonst üblichen ^{32}P -dUTP bietet einige Vorteile. Radioaktiv markierte Sonden können nur kurze Zeit verwendet werden, weil die Radioaktivität schnell abklingt. Benutzt man DIG-markierte Sonden, so können diese bis zu einem Jahr und länger gelagert werden und in diesem Zeitraum wiederholt verwendet werden. Außerdem sind die Expositionszeiten (Kap. 3.2.5) wesentlich kürzer im Vergleich zur Detektion nach ^{32}P -Markierung.

Arbeitsvorschrift

500 ng der gereinigten DNA werden 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert und danach sofort bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min abgekühlt. Auf Eis fügt man $2\ \mu\text{l}$ Hexanukleotidmix, $2\ \mu\text{l}$ dNTP-Labelingmix, Aqua bidest. (ad $19\ \mu\text{l}$) und $1\ \mu\text{l}$ Klenow-Enzym zu. Der Ansatz wird kurz anzentrifugiert und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Durch Zugabe von $2\ \mu\text{l}$ EDTA-Lösung ($0,2\ \text{mol/l}$, pH 8) wird die Markierungsreaktion beendet. Nach Zusatz von $2,5\ \mu\text{l}$ Natriumacetat-Lösung ($3\ \text{mol/l}$, pH 5,5) und $75\ \mu\text{l}$ vorgekühltem Ethanol wird die DNA bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min ausgefällt und danach 20 min bei $14000\times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Das luftgetrocknete Pellet wird in $50\ \mu\text{l}$ TE-Puffer gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.6 Ermittlung der Einbaurate markierter Uridinphosphate

Man ermittelt die Einbaurate markierter Uridinphosphate einerseits, um zu zeigen, daß die Markierungsreaktion erfolgreich verlaufen ist, und andererseits, um die Ausbeute an DIG-markierter DNA abschätzen zu können. Als Kontrolle dient Digoxigenin-markierte pBR328-DNA von bekannter Konzentration.

Von der Kontroll-DNA wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, so daß Lösungen der Konzentrationen 1 pg/ μ l, 10 pg/ μ l, 100 pg/ μ l, 1 ng/ μ l und 10 ng/ μ l zur Verfügung stehen. Die DNA-Probe wird ebenfalls in Dezimalschritten verdünnt.

Je 1 μ l jeder Verdünnung wird punktförmig auf einer Nylonmembran aufgetragen. Nach dem Trocknen wird die DNA durch UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert.

Die Detektion wird gemäß der in Kapitel 3.2.5 beschriebenen Vorschrift durchgeführt. Die Ausbeute an markierter DNA kann nun durch Vergleich mit der durch die Kontroll-DNA auf dem Film erzeugten Schwärzung ermittelt werden.

3.2 Northern Technik

3.2.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus INS-1 Zellen wird mittels der 1-Schritt-Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Hierbei wird die Lyse der Zellen durch die chaotrope Substanz Guanidiniumthiocyanat erreicht, die sowohl Proteine denaturiert, als auch RNasen inaktiviert. Die Kombination von Guanidiniumthiocyanat mit dem Reduktionsmittel Mercaptoethanol wurde 1979 von Chirgwin et al. verwendet, um intakte RNA aus RNase-reichem Gewebe, z.B. Pankreas, zu isolieren. Chomczynski und Sacchi ersetzten die Ultrazentrifugation in CsCl durch eine Phenol-Chloroformextraktion. Nach dem Zentrifugieren befinden sich DNA und Proteine in der Interphase und in der Phenolphase. Die RNA ist in der wäßrigen Phase und kann aus dieser mittels Isopropanolfällung isoliert werden. Das RNA-Pellet wird in Formamid gelöst. Formamid ist als Lösungsmittel besser geeignet als Wasser oder TE-Puffer (Chomczynski, 1992), weil es die RNA vor dem Abbau durch RNasen schützt. Dadurch bleiben die RNA-Proben trotz wiederholtem Auftauen und Einfrieren über ein Jahr lang stabil.

Arbeitsvorschrift

Nach Absaugen des Mediums werden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und durch Abschaben in dieser Lösung suspendiert. Die Zellsuspension wird 5 min bei 1000xg und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in Lösung D suspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Natriumacetat-Lösung (3 mol/l), 1 ml ss-Phenol und 200 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (24+1) wird 10 s gevortext und 15 min auf Eis inkubiert. Danach zentrifugiert man 20 min bei 10000xg und 4 °C. Der wäßrige Überstand wird in neue EppendorfgeläÙe überführt. Durch Zugabe von einem Teil Isopropanol und Inkubation bei -20 °C für eine Stunde wird die RNA ausgefällt. Durch Zentrifugation bei 10000xg und 4 °C für 20 min erhält man ein Pellet, das nach Verwerfen des Überstandes in 300 µl Lösung D aufgelöst wird. Wieder wird das gleiche Volumen Isopropanol zugesetzt und bei -20 °C für eine Stunde inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 10000xg und 4 °C für 20 min und Verwerfen des Überstandes wird das RNA-Pellet mit 50 µl eiskaltem 75 %igen Ethanol gewaschen und die Waschlösung nach Zentrifugieren für 5 min bei 10000xg und 4 °C verworfen. Das luftgetrocknete RNA-Pellet wird in 20 µl Formamid gelöst und kann bei -20 °C gelagert werden.

Der Gehalt an RNA wird durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm sollte annähernd 2:1 sein; dann ist die RNA weitgehend von Verunreinigungen durch Proteine, die bei 280 nm absorbieren, abgetrennt.

3.2.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von Makromolekülen nach ihrer Ladung und Größe. Für die Auftrennung von RNA werden denaturierende Agarosegele verwendet. Die denaturierenden Agentien Glyoxal, Methyl-Quecksilberhydroxid oder Formaldehyd verhindern, daß sich bei den RNA-Molekülen Sekundärstrukturen ausbilden, die die Wanderungsgeschwindigkeit verändern. Um RNA-Moleküle mit Größen zwischen 0,5 und 10 kb aufzutrennen, wird die Gelelektrophorese in einem formaldehydhaltigen 1 %igen Agarosegel durchgeführt. Als Elektrophoresepuffer dient MOPS-Puffer.

Um Sekundärstrukturen der RNA schon vor dem Auftragen auf das Gel zu zerstören, wird die RNA in dem Probenpuffer, der Formamid und Formaldehyd enthält, erhitzt.

Probenvorbereitung

10 µg RNA werden mit 2 µl MOPS, 4 µl Formaldehyd und Formamid (ad 20 µl) versetzt. Der Ansatz wird kurz an zentrifugiert und durch Erhitzen auf 65 °C für 10 min denaturiert. Nach Zugabe von 2 µl Färbemix wird die Lösung in die Taschen des Gels pipettiert.

Die Elektrophorese wird bei 70 V für 2 h durchgeführt.

3.2.3 Northern Blot

Der Northern Blot ist von dem Southern Blot abgeleitet, der 1975 von Southern entwickelt wurde. Er ist ein Verfahren zum Transfer und zur Immobilisierung von geoelektrophoretisch aufgetrennten RNA-Molekülen auf geeignete Membranen. Nylonmembranen bieten gegenüber Nitrocellulosemembranen den Vorteil, daß sie mehrere Hybridisierungen (Kap. 3.2.4) hintereinander erlauben, ohne daß es zu einem Verlust des Hybridisierungssignals kommt. Außerdem binden Nylonmembranen Nukleinsäuren nach UV-Bestrahlung irreversibel, so daß es nicht wie bei Nitrocellulosemembranen zum Ablösen der RNA während der Hybridisierungsreaktion und der nachfolgenden Waschschriffe kommen kann. Weiterhin sind Nylonmembranen im Gegensatz zu Nitrocellulosemembranen für die Chemilumineszenzdetektion (Kap. 3.2.5) geeignet.

Der Transfer kann mittels verschiedener Methoden erfolgen: Vakuumtransfer, Elektrobloiting oder Kapillartransfer. Gewöhnlich wird beim Kapillartransfer aufsteigend gebloitet. Das hat den Nachteil, daß bei beginnender Dehydratation des Gels durch das Gewicht, das auf dem Gel lastet, die Gelporen noch weiter zerstört werden. Dadurch wird der Übergang der Nukleinsäuren aus dem Gel auf die Membran beeinträchtigt. Um dies zu verhindern, wurde ein absteigender Kapillarblot durchgeführt.

Der Transfer kann mit neutralem oder alkalischem Transferpuffer durchgeführt werden. Alkalischer Transfer bietet den Vorteil, daß die Transferdauer verkürzt wird. Wird ein neutraler Transfer normalerweise über Nacht durchgeführt, so dauert der alkalische Transfer je nach Dicke des Gels und Größe der Nukleinsäuremoleküle zwischen ein und drei Stunden.

Arbeitsvorschrift

Das Gel wird viermal je 10 min in Aqua bidest. gewaschen. Der Blot wird absteigend aufgebaut, so daß auf einem Stapel an Filterpapier die Membran und darauf das Gel

und einige angefeuchtete Lagen Filterpapier liegen. Das oberste Filterpapier steht in Kontakt mit dem Transferpufferreservoir. Die Transferzeit beträgt drei Stunden. Danach wird die Nylonmembran an der Luft getrocknet. Die Nukleinsäuren werden durch UV-Bestrahlung (125 kJ/cm^2) auf der Membran fixiert. Die Membran wird in Folie eingeschweißt und bis zur Hybridisierung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.2.4 Hybridisierung

In der Molekularbiologie bedeutet Hybridisierung die Zusammenlagerung zweier Nukleinsäureeinzelstränge, die komplementäre Basensequenzen besitzen, zu einem Doppelstrang. Hybridisierung kann zwischen zwei DNA-Strängen, einem DNA- und einem RNA-Strang und zwischen zwei RNA-Strängen stattfinden. Die auf der Nylonmembran immobilisierten RNA-Moleküle können also mit komplementären, markierten DNA- bzw. RNA-Fragmenten (Kap. 3.1.5) hybridisieren und mit Hilfe der Markierung nachgewiesen werden.

Der Hybridisierungsvorgang läuft in drei Schritten ab: Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen. Während der Prähybridisierung werden Membranstellen, die durch unspezifisches Binden der markierten Sonde zu unerwünschtem Hintergrund führen können, durch ein Blockierungsreagenz besetzt. Im Hybridisierungsschritt wird die Membran mit einer Lösung inkubiert, die die spezifische, DIG-markierte Sonde enthält. Der Hybridisierungspuffer enthält ebenfalls das Blockierungsreagenz und Formamid. Formamid ermöglicht die Hybridisierung bei niedrigeren Temperaturen und begünstigt die Bildung von DNA-RNA-Hybriden gegenüber der Renaturierung zweier DNA-Stränge. Die Hybridisierung mit α_{i2} -cDNA-Sonde wird in DNA-Hybridisierungspuffer bei $42 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt, die mit α_S -cDNA-Sonde bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Hybridisierung mit der RNA-Sonde für β -Actin von Neye (1996) erfolgte in RNA-Hybridisierungspuffer bei $68 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sonde	Hybridisierungstemperatur	Waschbedingungen 1	Waschbedingungen 2
α_{i2} -DNA	$42 \text{ }^\circ\text{C}$	2x10 min, RT	3x15 min, $65 \text{ }^\circ\text{C}$
α_S -DNA	$50 \text{ }^\circ\text{C}$	2x10 min, RT	3x15 min, $68 \text{ }^\circ\text{C}$
β -Actin-RNA	$68 \text{ }^\circ\text{C}$	2x10 min, RT	3x15 min, $68 \text{ }^\circ\text{C}$

Tab. 3.2 Hybridisierungs- und Waschbedingungen

Die Abkürzung RT steht für Raumtemperatur.

Nach dem Hybridisieren wird die Hybridisierungslösung abgegossen und für die weitere Verwendung eingefroren. Die Membran wird gewaschen, um überschüssige Sonde zu entfernen. Die Bedingungen während der Waschschrte werden so angepaßt, daß nur bei kompletter Basenpaarung mit der immobilisierten RNA die Hybride stabil bleiben. Die Membran wird im ersten Waschschrte mit 2xSSC gewaschen und im zweiten Waschschrte mit 0,1xSSC+0,1 % SDS.

3.2.5 Chemilumineszenzdetektion

Durch die Markierung mit Digoxigenin kann die RNA über einen Immunoblot detektiert werden.

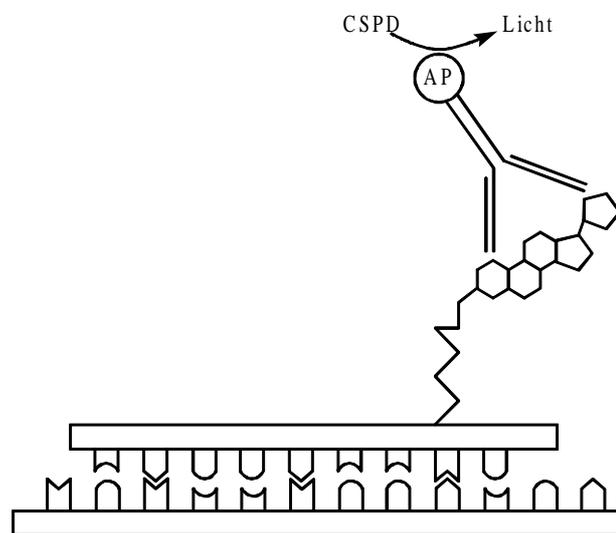


Abb. 3.2 Mechanismus der Hybridisierung und Detektion mittels DIG-Markierung

Die DIG-markierte Sonde hybridisiert mit der komplementären RNA auf der Membran. Bei der Detektion bindet ein Antikörper an das Digoxigenin. Durch Aktivierung der alkalischen Phosphatase des Antikörpers wird das Chemilumineszenzsubstrat CSPD gespalten und erzeugt Licht.

Die Chemilumineszenzdetektion ist ein dreischrittiger Prozeß. Zuerst wird die gewaschene Nylonmembran mit dem Blockierungsreagenz-haltigen Puffer 2 behandelt, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Dann inkubiert man mit dem Puffer, der neben dem Blockierungsreagenz den Antikörper enthält. Als Antikörper wird ein Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment verwendet, das mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Im dritten Schritt wird das Chemilumineszenzreagenz CSPD (3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'chloro)tricyclo [3.3.1.1.^{3,7}]decan}-4-yl)Phenylphosphat, Dinatriumsalz) dazugegeben.

Durch die alkalische Phosphatase wird CSPD enzymatisch dephosphoryliert. Dabei entsteht das entsprechende Hydroxyphenyl-1,2-dioxetan. Durch die Oxidation des Dioxetans unter basischen Pufferbedingungen bildet sich ein instabiles Phenoxid-dioxetan. Dieses zerfällt in das chlorierte Adamantanon und das singlet angeregte Methyl-meta-oxybenzoat, wobei Licht mit einer Wellenlänge von 477 nm emittiert wird.

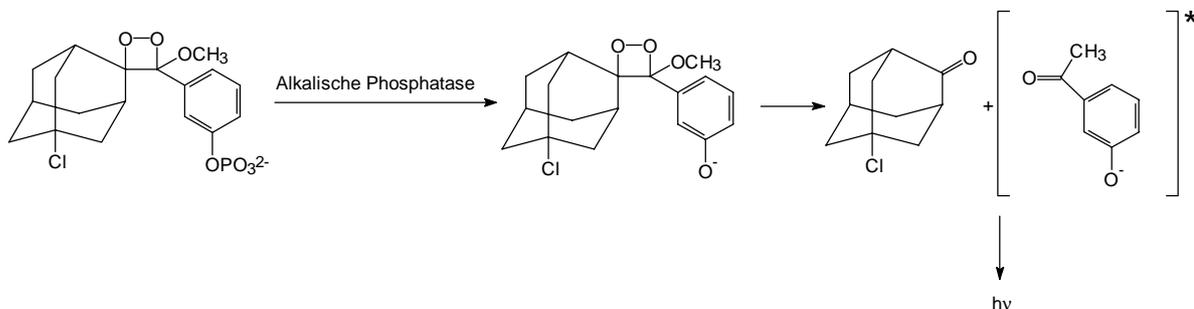


Abb. 3.3 Chemilumineszenzreaktion

CSPD wird durch die alkalische Phosphatase zum Hydroxyphenyl-1,2-dioxetan dephosphoryliert. Das im nächsten Schritt entstehende Oxidationsprodukt ist instabil und zerfällt unter Lichtemission.

Die Lichtemission wird mit einem Röntgenfilm aufgenommen. Der Schwärzungsgrad auf dem Röntgenfilm ist ein relatives Maß für die Konzentration der detektierten RNA (Höltke und Kessler, 1990).

Arbeitsvorschrift

Die Membran wird 5 min in Puffer 1 gewaschen und dann 30 min in Puffer 2 inkubiert. Der Anti-DIG-Antikörper mit der ankonjugierten alkalischen Phosphatase wird 1:10.000 in Puffer 2 verdünnt. Nach Absaugen der Blockierungslösung wird die Membran 30 min mit der Antikörperverdünnung inkubiert. In einer neuen Petrischale wird die Membran zweimal je 15 min in Puffer 1 mit 0,3 % Tween gewaschen. Schließlich äquilibriert man die Membran für 5 min in Puffer 3 und schafft so ein geeignetes pH-Milieu für die alkalische Phosphatase. Überschüssige Flüssigkeit läßt man von der Membran ablaufen und legt die Membran einige Sekunden mit der Rückseite nach unten auf ein Stück Whatman-Papier, ohne aber die Membran völlig trocken werden zu lassen. Die Membran wird auf eine Metallplatte gelegt und mit 5 µl/cm² CSPD-Verdünnung beträufelt, so daß die Lösung gleichmäßig verteilt ist. Die feuchte Membran wird mit Frischhaltefolie bedeckt und für 30 min bei 37 °C inkubiert, um die Reaktion ins steady-state zu bringen. In einer Fotokassette wird ein Röntgenfilm

durch die entstehende Chemilumineszenz belichtet. Nach Ende der Expositionszeit wird der Film 30-60 s entwickelt, 30 s gewässert, 5 min fixiert und abschließend noch 30 min gewässert.

Mit einer Membran können Mehrfachexpositionen durchgeführt werden, da die Chemilumineszenz über einen Zeitraum von 24 Stunden erhalten bleibt. Für weitere Hybridisierungen mit anderen Sonden kann die Membran feucht aufbewahrt werden. Vor dem erneuten Hybridisieren müssen Sondenreste durch dreimaliges Waschen bei 70 °C mit 0,1x SSC mit 0,1 % SDS über je 15 min entfernt werden.

3.2.6 Laserdensitometrie

Bei der Chemilumineszenzdetektion erhält man geschwärzte Banden, die der Lage und Menge der untersuchten mRNA auf der Membran entsprechen. Um diese Schwärzungen zu quantifizieren, wird der Röntgenfilm mit einem Laserdensitometer vermessen. Dabei wird der Film mit einem Laserstrahl abgetastet und die Lichtabsorption an den geschwärzten Banden ermittelt. Die mit dem Laserstrahl erfaßte Spurbreite ist so eingestellt, daß die gesamte Bande vermessen wird. Die ermittelte Absorption ist damit ein Maß für die Fleckgröße und den Schwärzungsgrad. Die Daten werden mit Hilfe der Software GelScan XL verarbeitet und ausgewertet. Dazu werden die Absorptionsspektren jeder Spur integriert und die Peakflächen, die den Banden der G-Protein-mRNA entsprechen, ausgerechnet. Um einen semiquantitativen Vergleich zu erhalten, werden die integrierten Flächen der einzelnen Banden eines Films in Beziehung zum Kontrollversuch gesetzt, der als 100 % definiert ist. Da der Schwärzungsgrad und die Fleckgröße von verschiedenen Faktoren, wie der Behandlung beim Blotten, dem Hybridisieren und vor allem der Belichtungszeit abhängen, können nur die Absorptionswerte, die von einem Film stammen, miteinander verglichen werden. Um Unterschiede in der Beladung des Gels oder beim Blotten auszuschalten, wird dann um den internen Standard, die β -Actin-mRNA, korrigiert.

3.3 PCR

Die Polymerasekettenreaktion PCR bietet eine Möglichkeit zur in vitro-Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Die Methode wurde von Mullis und seinen Mitarbeitern (1986, 1987) entwickelt und mit dem Namen Polymerasekettenreaktion bezeichnet.

DNA-Polymerasen synthetisieren in 5'→3'-Richtung den zu einem DNA-Einzelstrang komplementären Strang, wobei sie allerdings an einer doppelsträngigen Stelle starten müssen. Dies bezeichnet man als *primer extension*. Bei der PCR werden nun zwei *primer* benutzt, wobei der erste *primer* zu einer Sequenz des einen DNA-Stranges komplementär ist und der zweite *primer* zu einer Sequenz des anderen DNA-Stranges. Damit die *primer* sich anlagern können, muß der DNA-Doppelstrang durch Hitzedenaturierung in zwei Einzelstränge aufgespalten werden. Die *primer* werden so ausgewählt, daß die an einem *primer* startende DNA-Synthese in Richtung auf den anderen *primer* abläuft. Dadurch kann der am ersten *primer* synthetisierte Strang im nächsten Zyklus mit Hilfe des zweiten *primers* verdoppelt werden. Dadurch wird die DNA-Sequenz, die von beiden *primern* flankiert wird, vervielfältigt.

Die Polymerasekettenreaktion läuft also in sich wiederholenden Zyklen ab, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht:

1. Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge
2. Anlagerung der *primer* (*annealing*)
3. Synthese des komplementären Stranges ausgehend von einem *primer* (*primer extension*)

Die grundlegenden Prinzipien, auf denen die PCR beruht, wurden schon Jahre vorher beschrieben (Kleppe et al., 1971; Panet et al., 1974). Ursprünglich wurde das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I zur Amplifizierung benutzt. Dieses Enzym ist aber nicht hitzestabil und wird bei den hohen Temperaturen, die nötig sind, um die DNA-Stränge zu denaturieren, inaktiviert. Deshalb mußte für jeden Zyklus ein neues Aliquot Enzym zugesetzt werden. Dieses Problem wurde durch die Einführung (Saiki et al., 1988) einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1974) gelöst. Dieses Enzym, das auch länger dauernde Inkubationen bei 95 °C übersteht, wird während des Hitzedenaturierungsschrittes der PCR kaum inaktiviert. Dies ermöglicht es, auch die Anlagerung der *primer* und die DNA-Synthese bei höheren Temperaturen durchzuführen. Dadurch wird die Häufigkeit falscher *primer*-Anlagerungen verringert und die Spezifität und Ausbeute der Reaktion verbessert. Außerdem kann die PCR leicht automatisiert werden, da ein wiederholter Zusatz des Enzyms entfällt.

Mit dieser Methode kann man ein DNA-Fragment aus 50 ng genomischer DNA innerhalb von 25-35 Zyklen auf eine Menge von 100 ng - 1 µg vermehren.

3.3.1 Reverse Transkription

Häufig genutzte Methoden zur Analyse und Detektion von RNA, wie z. B. die Northern Technik (Kap. 3.2), sind oft nicht empfindlich genug, um RNA nachzuweisen, die nur in geringen Mengen exprimiert wird. Mit Hilfe der PCR bietet sich die Möglichkeit, kleine DNA-Mengen zu vervielfältigen. Da RNA-Moleküle aber nicht als Vorlage bei der PCR dienen können, muß die vorliegende RNA zuerst in komplementäre DNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mittels reverser Transkription.

Reverse Transkriptasen sind RNA-abhängige DNA-Polymerasen. Zusätzlich können reverse Transkriptasen aber auch ausgehend von einem einzelsträngigen DNA-Strang den komplementären Strang synthetisieren. Die viralen reversen Transkriptasen des *avian myoblastosis*-Virus (AMV, ein Vogel-Myeloblastosevirus) und des *moloney murine leukemia*-Virus (M-MuLV, ein Maus-Leukämievirus) besitzen außerdem noch RNase H-Aktivität. Nach Zugabe von Hexanukleotiden als *Zufallsprimer* oder von *Oligo(dT)-primern* wird ein zu der RNA komplementärer DNA-Strang aufgebaut. Dieser einsträngige cDNA-Strang dient als Vorlage bei der PCR.

Arbeitsvorschrift

Für die gewünschte Anzahl an Reaktionsansätzen wird ein Mastermix hergestellt. Dieser enthält pro Reaktionsansatz 2 µl Reaktionspuffer, 4 µl MgCl₂-Lösung (25 mmol/l), 2 µl Deoxynukleotidmix, 2 µl *Zufallsprimer*, 1 µl RNase-Inhibitor, 0,8 µl AMV-reverse Transkriptase, 1 µg Gesamt-RNA und Aqua bidest. ad 20 µl. Dieser Mastermix wird aliquotiert und 10 min bei 25 °C inkubiert. Während dieser Zeit erfolgt die Anlagerung der *primer*. Die reverse Transkription findet während einer einstündigen Inkubation bei 42 °C statt. Dann erhitzt man für 5 min auf 99 °C, um die AMV-reverse Transkriptase zu denaturieren und kühlt sofort für 5 min auf 4 °C ab. Die erhaltene cDNA wird bei -20 °C gelagert.

3.3.2 PCR der α_{i1} - und α_o -cDNA

Zur Amplifizierung der cDNA von α_{i1} und α_o werden die von Valerio et al. (1993) beschriebenen Bedingungen übernommen (Tab. 3.3).

Denaturierung	94 °C	30 s
<i>primer annealing</i>	60 °C	30 s
<i>primer extension</i>	72 °C	60 s

Tab. 3.3 Zyklusbedingungen der PCR

Nach dem Durchlaufen von 30 Zyklen wird eine abschließende Inkubation über 8 min zur *primer extension* durchgeführt. Gearbeitet wird mit einer MgCl₂-Konzentration von 1,5 mmol/l, einer *primer*-Konzentration von 1 µmol/l und einer Deoxynukleotidkonzentration von 200 µmol/l.

α-Untereinheit	<i>primer</i> -Sequenz	Nukleotide	PCR-Produkt
α _{i1}	5'-CTTTATGACCGCGGAGCTCGCC-3'	569-590	541 bp
	5'-CTTCATATGTGTTTGAGCCTGC-3'	1089-1110	
α _o	5'-GTGACGTGGTGAGTCGCATGGA-3'	1029-1050	631 bp
	5'-TTCTTTGTTGGGTGAGCGGTTT-3'	1639-1660	

Tab. 3.4 Oligonukleotidprimer für die PCR

Arbeitsvorschrift

Ein Mastermix wird hergestellt, der pro Reaktionsansatz 5 µl PCR-Puffer, 1 µl dNTP-Mix, je 50 pmol beider primer, 1 U Taq-DNA-Polymerase und Aqua bidest. ad 45 µl enthält. Dieser Mastermix wird aliquotiert. Zu jedem Reaktionsansatz werden 5 µl DNA-Vorlage pipettiert, wobei die aus der reversen Transkription erhaltene cDNA (Kap. 3.3.1) direkt eingesetzt werden kann. Als Vergleich dient eine Lösung, die 10 ng der DNA-Fragmente aus den Kontrollplasmiden (Kap. 3.1.4) in 5 µl enthält. Ein Ansatz ohne DNA-Vorlage dient der Kontrolle der Reaktionsbedingungen. Die PCR-Gefäße werden gemischt, mit 100 µl Mineralöl überschichtet und in einem Thermocycler unter den in Tab. 3.3 beschriebenen Bedingungen inkubiert. Nach der abschließenden *extension* wird auf 4 °C gekühlt. Die Proben können bei -20 °C eingefroren werden.

3.3.3 Identifizierung der amplifizierten Fragmente

Um zu untersuchen, ob die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente auch wirklich den gewünschten Sequenzen entsprechen, kommen verschiedene Methoden in Frage. Als erstes

wird kontrolliert, ob die Größe der vervielfältigten DNA-Fragmente mit der publizierten DNA-Sequenz übereinstimmt. Ist dies nicht der Fall, handelt es sich um unspezifische Amplifikationsprodukte. Um auszuschließen, daß es sich um eine zufällige Übereinstimmung der Molekülgrößen handelt, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dafür bieten sich entweder eine Sequenzierung oder ein Nachweis mittels Hybridisierung mit bekannten Sonden nach der Southern Technik an. In dieser Arbeit wurde die zweite Möglichkeit gewählt.

3.3.3.1 Bestimmung der Größe

Entsprechend der von Reed und Jones (1987) publizierten Sequenzen beträgt die Länge des PCR-Produktes von α_{i1} 541 bp und von α_o 631 bp. Zur Größenbestimmung der aus RNA nach reverser Transkription amplifizierten DNA-Fragmente wird eine Gelelektrophorese durchgeführt. Daneben wird ein DNA-Größenstandard eingesetzt, dessen DNA-Fragmente eine Größe zwischen 100 bp und 1500 bp aufweisen. Als zusätzliche Positivkontrolle dienen die aus der Plasmid-cDNA (Kap. 3.1.4) amplifizierten DNA-Fragmente. Die Gelelektrophorese wird in einem 1 %igen Agarosegel mit TAE-Puffer als Elektrophoresepuffer durchgeführt. Bei 100 V beträgt die Dauer der Elektrophorese eine Stunde. Der Zusatz von Ethidiumbromid ermöglicht das Erkennen der nach ihrer Größe aufgetrennten DNA-Banden unter UV-Licht.

3.3.3.2 Southern Technik

Die Southern Technik ist eine von Southern (1975) entwickelte Technik zum Nachweis und zur Analyse von DNA-Fragmenten. Die Prinzipien der Southern Technik wurden später in modifizierter Weise auch für Untersuchungen von RNA (Northern Technik, Kap. 3.2) und Proteinen (Western Technik) herangezogen. Die Southern Technik kann in drei Teilschritte untergliedert werden: die Auftrennung der DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese (Kap. 3.2.2), der Transfer der DNA-Fragmente auf eine Trägermembran durch Blotting und der Nachweis von spezifischen Fragmenten durch Hybridisierung mit markierten Sonden.

Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente ist der zentrale Schritt der Southern Technik. Im Gegensatz zu RNA-Gelen müssen DNA-Gele vor dem Transfer vorbehandelt werden. Durch Einwirken von Salzsäure werden einige Zucker-Phosphat-Bindungen der DNA gespalten und die so entstehenden kleineren Bruchstücke besitzen eine bessere Mobilität aus dem Gel auf die Membran. Diese Behandlung ist bei den mittels PCR

entstehenden ohnehin kurzen Stücken nicht nötig. Durch alkalisches Waschen (Denaturierung) des Trenngels und die Verwendung einer hoch salzhaltigen Transferlösung wird sichergestellt, daß die DNA schließlich in denaturierter, einzelsträngiger Form vorliegt. Dies ist wichtig für die im nächsten Schritt erfolgende Hybridisierung mit markierter Sonde.

Bei der Kapillartransfer-Methode werden die DNA-Fragmente aus dem Gel auf die Membran gesaugt (geblottet, von engl. to blot = aufsaugen). Als Transferpuffer wird 20xSSC-Puffer verwendet. Die Transferzeit beträgt drei Stunden.

Die Hybridisierung erfolgt wie unter 3.2.4 beschrieben. Verwendet werden DIG-markierte DNA-Sonden, die von der Gesamt-cDNA von α_{i1} und α_o hergestellt werden, da die mittels PCR amplifizierten Fragmente nicht den Abschnitten der in Kapitel 3.1.4 beschriebenen spezifischen Sonden entsprechen. Hybridisiert wird bei einer Temperatur von 42 °C. Der zweite Waschschrift erfolgt bei 68 °C. Die Detektion wird gemäß Kapitel 3.2.5 durchgeführt.

3.4 Inkubationsbedingungen der Versuche zur Beeinflussung des mRNA-Gehaltes

Der Einfluß von GIP, GLP-1, Adrenalin, Isoprenalin, UK 14.304, Lithium und Galanin einzeln und in Kombination mit Verapamil auf den Gehalt an α_s - und α_{i2} -mRNA wird untersucht. Dafür werden INS-1 Zellen in großen Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² und 20 ml Komplettmedium ausgesät. Am fünften Tag wird eine Zelldichte von $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml erreicht.

Die Zellen werden über vier, acht und 24 Stunden mit den oben angegebenen Substanzen inkubiert. Für eine 24stündige Inkubation wird am vierten Tag ein Mediumwechsel mit anschließendem Zusatz der Versuchssubstanz durchgeführt. Bei Inkubationen über vier und acht Stunden erfolgt der Mediumwechsel samt Zugabe der Versuchssubstanz am fünften Tag. Auch bei den als Kontrolle dienenden Zellen wird ein Mediumwechsel durchgeführt. So können die Zellen am fünften Tag zum gleichen Zeitpunkt geerntet werden. Durch diese Inkubationsbedingungen wird sichergestellt, daß eine Änderung des mRNA-Gehaltes nicht auf Unterschieden im Entwicklungsstadium der Zellen beruht. Die eingesetzten Konzentrationen der Versuchssubstanzen, die Inkubationszeiten und die eingesetzten Passagen der Zellkultur sind Tab. 3.5 zu entnehmen.

Substanz	Konzentration	Inkubationszeit	Passage
Adrenalin	50 µmol/l	4, 8, und 24 h	64-67, 83-84
Isoprenalin	10 µmol/l	4, 8, und 24 h	65-68, 83-84
UK 14.304	1 µmol/l	4, 8, und 24 h	77-78, 88-89
GIP	10 nmol/l	4, 8, und 24 h	65-68, 88-89
GLP-1	10 nmol/l	4, 8, und 24 h	65-68, 88-89
Galanin	50 nmol/l	8 h	64-67
Lithium	10 mmol/l	8 h	64-67
Verapamil	50 µmol/l	8 h	64-67

Tab. 3.5 Inkubationsbedingungen der Versuche zur Beeinflussung des mRNA-Gehaltes

3.5 Versuche zur Insulinsekretion

Die Versuche zur Insulinsekretion der INS-1 Zellen werden in 24er-Multiwells durchgeführt. Die Zellen werden in einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in jedem Well ausgesät und nach fünf Tagen für die Sekretionsversuche eingesetzt. Die Insulinsekretion wird während einer statischen Inkubation ermittelt, das heißt die Zellen befinden sich in einem bestimmten Volumen an Lösung, in welchem sich das sezernierte Insulin ansammelt. Auf diese Weise kann nur die Gesamtmenge an Insulin, die während des Untersuchungszeitraumes freigesetzt wird, gemessen werden. Den zeitlichen Verlauf der Insulinsekretion kann man mit Hilfe eines Perifusionsversuches darstellen, bei dem die Zellen fortlaufend mit frischer Lösung umspült werden.

In dieser Arbeit sind statische Sekretionsversuche durchgeführt worden, bei denen die INS-1 Zellen erst mit verschiedenen Substanzen vorinkubiert werden, bevor die Insulinsekretion untersucht wird.

Arbeitsvorschrift

INS-1 Zellen werden über 8 h in Kompletmedium mit oder ohne Zusatz der zu testenden Substanzen bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert. Danach werden die Zellen auf Eis dreimal mit je 1 ml KRH-Puffer mit 3,0 mmol/l Glucose gewaschen. Für den folgenden Sekretionsversuch über 90 min werden die Zellen mit 1 ml KRH-Puffer mit

8,3 mmol/l Glucose (Kontrolle) oder 1 ml KRH-Puffer mit 8,3 mmol/l Glucose und den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Eine Inkubation mit 1 ml KRH-Puffer mit 3,0 mmol/l Glucose dient zur Kontrolle, ob eine Steigerung der Glucosekonzentration auf 8,3 mmol/l, wie sie in den anderen Wells vorliegt, einen Anstieg der Insulinsekretion zur Folge hat. Nach Beendigung der Inkubation wird die Lösung im Multiwell durch vorsichtiges Schwenken durchmischt, auf Eis werden je 100 µl des Überstandes abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

Die Menge an Insulin wird mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der Doppelantikörpermethode (Morgan und Lazarow, 1963; Hales und Randle, 1963). Hierbei konkurrieren eine bekannte Menge an radioaktiv markiertem ¹²⁵I-Insulin mit der zu bestimmenden Menge an unmarkiertem Insulin um die begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Der zweite Antikörper ist gegen den Insulinantikörper gerichtet und ermöglicht unter Zusatz von weiterem Carrier-IgG das Ausfällen des gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexes. Die Radioaktivität des gefällten ¹²⁵I-Insulins wird im Gamma-Counter vermessen. Anhand einer Kalibrierungskurve von bekannten Ratteninsulinmengen kann die zu bestimmende Insulinmenge errechnet werden. Da der Methode eine Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde liegt, wird nur das Insulin erfaßt, das mit dem eingesetzten Antikörper reagiert. Berechnet wird also die Menge an immunoreaktivem Insulin (IRI).

Arbeitsvorschrift

Die bei -20 °C gelagerten Proben der Insulinsekretionsversuche werden aufgetaut und 10 µl jeder Probe werden mit RIA-Puffer auf 400 µl verdünnt. Alle Lösungen werden im Eisbad hergestellt und im Kühlschrank gelagert. Von der verdünnten Probe werden 100 µl in einem RIA-Röhrchen mit RIA-Puffer auf 200 µl aufgefüllt. Für die Kalibrierungskurve wird vom Ratteninsulinstandard mit RIA-Puffer eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen zwischen 0 und 25 µU Insulin/200 µl erstellt. Die Lösungen der Verdünnungsreihe werden geteilt, so daß jede Verdünnung doppelt bestimmt wird.

Den Proben- und Kalibrierungslösungen werden je 100 µl ¹²⁵I-Insulin und Anti-Ratteninsulin-IgG (1. Antikörper) zugesetzt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (NSB) enthalten zwei Ansätze 300 µl RIA-Puffer und 100 µl ¹²⁵I-Insulin, aber nicht den 1. Antikörper. Um die eingesetzte Menge an Radioaktivität (*total counts*, TC)

zu ermitteln, werden zwei RIA-Röhrchen nur mit 100 μl ^{125}I -Insulin ohne weitere Zusätze gefüllt. Die maximale Bindung des Antikörpers (B_0) wird bestimmt, indem 200 μl RIA-Puffer, der kein unmarkiertes Insulin enthält, mit 100 μl ^{125}I -Insulin und 100 μl Anti-Ratteninsulin-IgG versetzt werden. Diese Ansätze werden gemischt und 20 h bei 4 °C inkubiert. Danach wird allen Lösungen mit Ausnahme der TC je 100 μl Anti-Meerschweinchen-IgG (2. Antikörper) und Carrier-IgG zur Vervollständigung der Fällung zugegeben und 2 h bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Waschpuffer wird der Niederschlag bei 4 °C über 20 min bei 2.500xg zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet 2 min im Gamma-Counter vermessen.

Die Umrechnung der Zerfallsrate in die absoluten Insulinmengen erfolgt mit Hilfe des RIA-Programms des Gamma-Counters.

3.6 Statistik

Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen werden, werden als Mittelwerte \pm S.E. bei Versuchen zum mRNA-Gehalt und als Mittelwert \pm S.E.M. bei Versuchen zur Insulinsekretion dargestellt. Die Mittelwerte werden aus der in der jeweiligen Abbildung angegebenen Anzahl unabhängiger Versuche (n) errechnet. Die statistische Prüfung auf Gleichheit der Varianzen wird mit dem F -Test durchgeführt. Kann gemäß F -Test die Homogenität der Streuung als statistisch signifikant nachgewiesen werden, schließt sich die Prüfung auf Gleichheit der Mittelwerte an. Mit Hilfe der Multifaktor-Varianzanalyse (Multifaktor-ANOVA) werden die Mittelwerte der einzelnen Versuchsreihen miteinander verglichen, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten zu erkennen. Die statistischen Berechnungen werden mit dem Statistikprogramm Statgraph Plus, Version 6.0 durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Vorkommen von G-Protein- α -Untereinheiten in INS-1 Zellen

Zum Vorkommen von G-Proteinen in INS-1 Zellen sind bis jetzt noch keine Untersuchungen publiziert worden. Anhand der Wirkung verschiedener Neurotransmitter und Hormone auf die Insulinsekretion und einige Effektorsysteme kann man auf das Vorhandensein von G-Proteinen schließen. So zeigten Asfari et al. (1992), daß Somatostatin und Adrenalin die Glucose-induzierte Insulinsekretion in INS-1 Zellen hemmen. Diese Hemmung wird in anderen insulinsezernierenden Zellen über inhibitorische G-Proteine vermittelt. GLP-1 stimuliert in INS-1 Zellen die Adenylylcyclase und führt intrazellulär zu einem Anstieg an cAMP (Waeber et al., 1993; Widmann et al., 1994). Da der GLP-1-Rezeptor an G_s gekoppelt ist, kann man aus der Aktivierung der Adenylylcyclase auf das Vorhandensein von G_s rückschließen.

Mit Hilfe der Northern Blot Technik wird untersucht, ob die mRNA von α_s , α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} und α_o in INS-1 Zellen exprimiert werden. Durch Einsatz spezifischer DIG-markierter DNA-Sonden können α_s -, α_{i2} - und α_{i3} -mRNA nachgewiesen werden (Abb. 4.1).

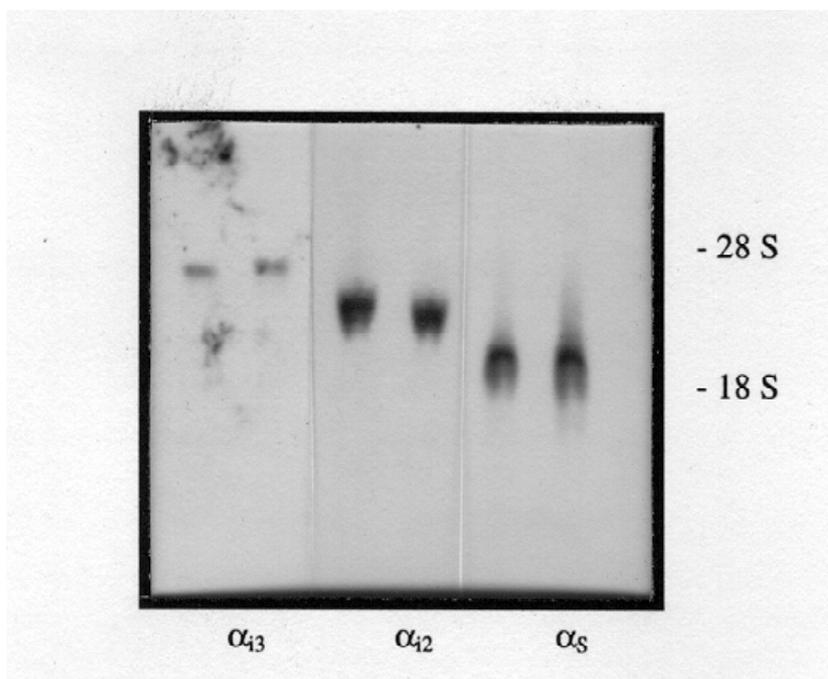


Abb. 4.1 Nachweis der mRNA von α_{i3} , α_{i2} und α_s mittels Northern Blot Technik

Je 10 μ g der Gesamt-RNA aus INS-1 Zellen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit spezifischen Sonden nachgewiesen. 18 S und 28 S geben die Lage der ribosomalen RNA an.

Die α_{i2} -cDNA-Sonde hybridisiert mit einer mRNA der Größe von 2,4 kb, die α_{i3} -Sonde detektiert eine mRNA von 3,5 kb und die α_S -Sonde detektiert eine mRNA von 1,9 kb. Diese mRNA-Größen stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten, die an anderen Zellen gewonnen wurden, überein (Weinstein et al., 1988; Kozasa et al., 1988; Eschenhagen et al., 1991). Wie auch in RINm5F-Zellen auf Proteinebene nachgewiesen (Cormont et al., 1991), sind α_S - und α_{i2} -mRNA in INS-1 Zellen mengenmäßig vorherrschend.

Die mRNA der α_{i1} - und α_0 -Untereinheit können im Northern Blot nicht detektiert werden, weil ihre Menge unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Da aber beide Untereinheiten in anderen insulinsezernierenden Zellen nachgewiesen worden sind (Kap. 5.1), wird mit einer sensitiveren Methode auf ihr Vorkommen getestet. Eine Möglichkeit, in geringen Mengen vorkommende mRNA zu vervielfältigen, bietet die RT-Polymerasekettenreaktion (Kap. 3.3). Nach einer reversen Transkription werden mittels spezifischer *primer* die cDNAs von α_{i1} und α_0 amplifiziert. Die Identifizierung erfolgt nach Gelelektrophorese anhand der Größe im Vergleich zu einem DNA-Größenstandard und einer Positivkontrolle (Abb. 4.2).

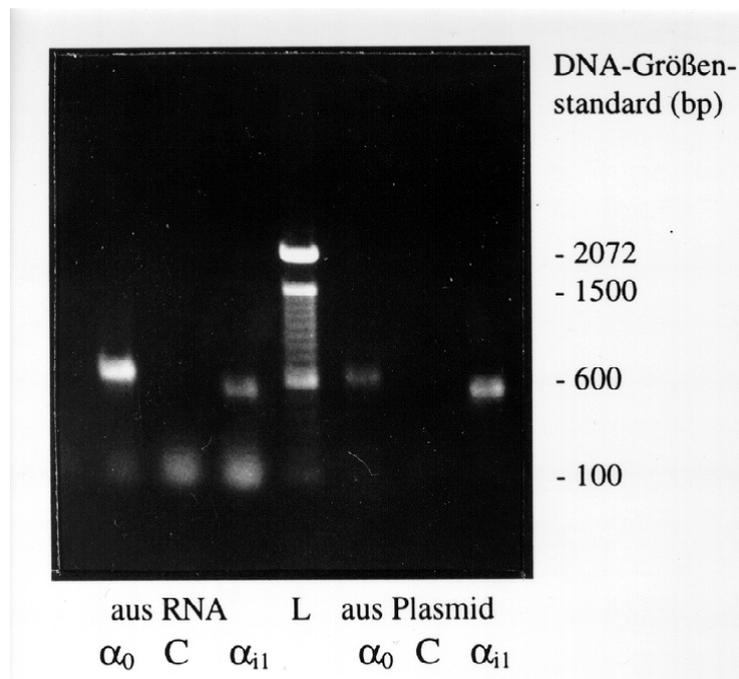


Abb. 4.2 Nachweis der PCR-Produkte von α_{i1} und α_0

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht detektiert. L ist der DNA-Größenstandard und C die Negativkontrolle.

Außerdem werden die Fragmente mit Hilfe der Southern Technik durch Hybridisierung mit spezifischen DIG-markierten Sonden nachgewiesen. Abb. 4.3 zeigt einen von drei gleichen Versuchen.

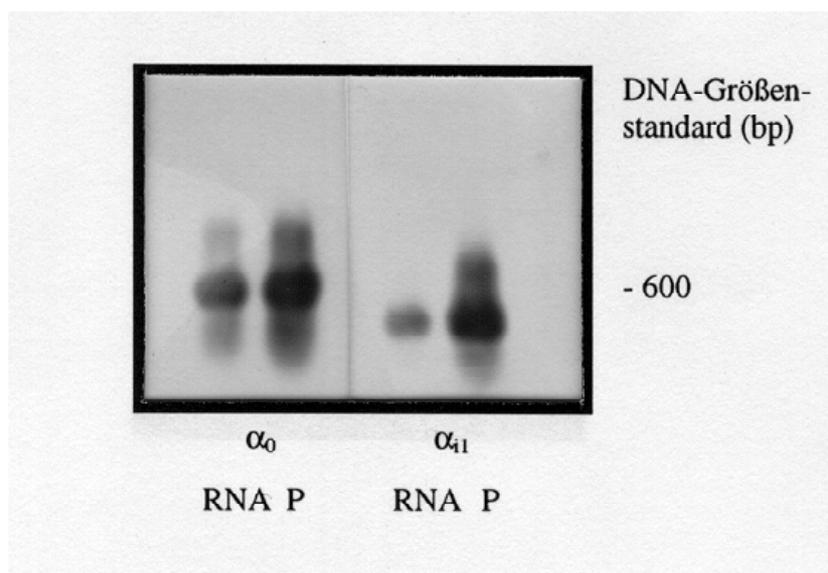


Abb. 4.3 Nachweis der PCR-Produkte von α_{i1} und α_o mittels Southern Technik

Die PCR-Produkte der RNA von INS-1 Zellen (nach reverser Transkription) bzw. der cDNA der Kontrollplasmide (P) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit spezifischen Sonden detektiert.

Wie von Valerio et al. (1993) angegeben, amplifiziert man von α_{i1} ein 541 bp-DNA-Fragment und von α_o ein 631 bp-DNA-Fragment. Die mRNAs der α_{i1} - und α_o -Untereinheiten können also ebenfalls in INS-1 Zellen nachgewiesen werden.

4.2 Regulation der α_s - und α_{i2} -mRNA

Chronische Stimulation eines G-Protein gekoppelten Rezeptors kann zeitabhängig zu einer verminderten zellulären Antwort führen. Dieser als Desensitivierung bezeichnete Vorgang kann sowohl auf einer Regulation des Rezeptors, als auch auf einer Regulation der beteiligten G-Proteine beruhen. Kommt es zu einer Änderung des Gehalts bestimmter G-Proteine, können verschiedene Signaltransduktionswege, die sich dieser G-Proteine bedienen, betroffen sein. Dadurch werden neben den Effekten des auslösenden Agonisten selbst auch Effekte, die über andere Rezeptoren vermittelt werden, beeinflusst. In diesem Fall spricht man von heterologer Desensitivierung.

Die Menge an verfügbarem G-Protein kann über verschiedene Mechanismen verändert werden. Eine Möglichkeit stellen dabei Unterschiede in der Menge der entsprechenden

mRNA dar. Eine Veränderung des mRNA-Gehalts hat in vielen Fällen Auswirkungen auf die Translation und damit auch auf die Proteinmenge.

4.2.1 Regulation durch Adrenozeptoragonisten

Die Desensitivierung des β -Adrenozeptor/Adenylylcyclase-Systems ist gut untersucht. Eine Langzeitstimulation mit β -Adrenozeptoragonisten vermindert die Ansprechbarkeit dieses Systems aufgrund einer verminderten Anzahl an β -Adrenozeptoren. Auch Rezeptor-unabhängige Stimulatoren der Adenylylcyclase sind in ihrer Wirkung herabgesetzt. Dies spricht für eine zusätzliche Beteiligung von G-Proteinen an der Desensitivierung.

Hadcock et al. (1990) zeigten in *S49 mouse lymphoma cells*, daß eine Stimulation mit Isoprenalin zu einem Anstieg des Gehalts an α_{i2} -mRNA führt, während die α_s -mRNA Menge kurzfristig ansteigt, aber bei länger dauernder Stimulation abnimmt. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Untersuchungen an Ratten (Eschenhagen et al., 1991). Eine chronische Infusion von Isoprenalin über vier Tage bewirkt einen Anstieg des α_{i2} -mRNA Gehalts im Rattenmyocard. Die α_s -mRNA Spiegel werden nicht beeinflusst.

Es stellt sich daher die Frage, ob eine derartige Regulation der mRNA von G-Protein- α -Untereinheiten nach Gabe eines Adrenozeptoragonisten auch in insulinsezernierenden Zellen stattfindet. Aus diesem Grund wird zuerst der zeitabhängige Einfluß von Adrenalin auf den Gehalt an α_s - und α_{i2} -mRNA in INS-1 Zellen untersucht.

Adrenalin (50 $\mu\text{mol/l}$) führt zeitabhängig zu einer Regulation sowohl des α_s -, als auch des α_{i2} -mRNA Gehaltes (Abb. 4.4). Die Menge an α_s -mRNA ist nach 4 und 8 h in behandelten Zellen mit 34 % und 58 % deutlich niedriger als in den Kontrollzellen, während nach 24 h wieder das Ausgangsniveau erreicht wird. Auch die α_{i2} -mRNA Spiegel sinken anfänglich unter 100 %. Durch achtstündige Inkubation mit Adrenalin verringert sich die α_{i2} -mRNA Menge auf 72 %. Nach 24 h bewirkt Adrenalin jedoch einen Anstieg des Gehalts der α_{i2} -mRNA auf 150 % der Kontrolle.

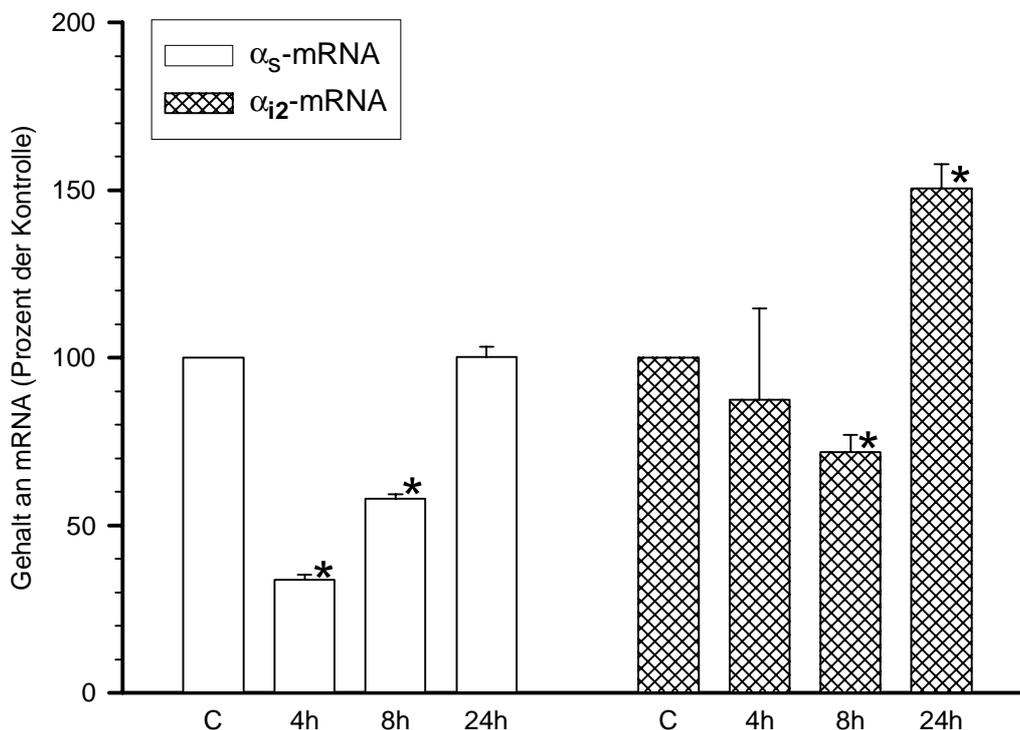


Abb. 4.4 Zeitabhängiger Einfluß von Adrenalin auf den Gehalt an α_5 - und α_2 -mRNA
 INS-1 Zellen wurden 4, 8 oder 24 h mit Adrenalin (50 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Als Kontrolle (C) dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E. der G-Protein-mRNA bezogen auf den internen Standard β -Actin-mRNA aus 3-4 Versuchen; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Multifaktor ANOVA.

Insulinsezernierende Zellen können sowohl β - als auch α -Adrenozeptoren enthalten (Kap. 1.2.4.1). Um festzustellen, über welche Rezeptoren die Regulation der mRNA vermittelt ist, wird der β -Adrenozeptoragonist Isoprenalin eingesetzt. Isoprenalin (10 $\mu\text{mol/l}$) ruft keine Änderung des mRNA-Gehalts hervor (Abb. 4.5). Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von der Kontrolle.

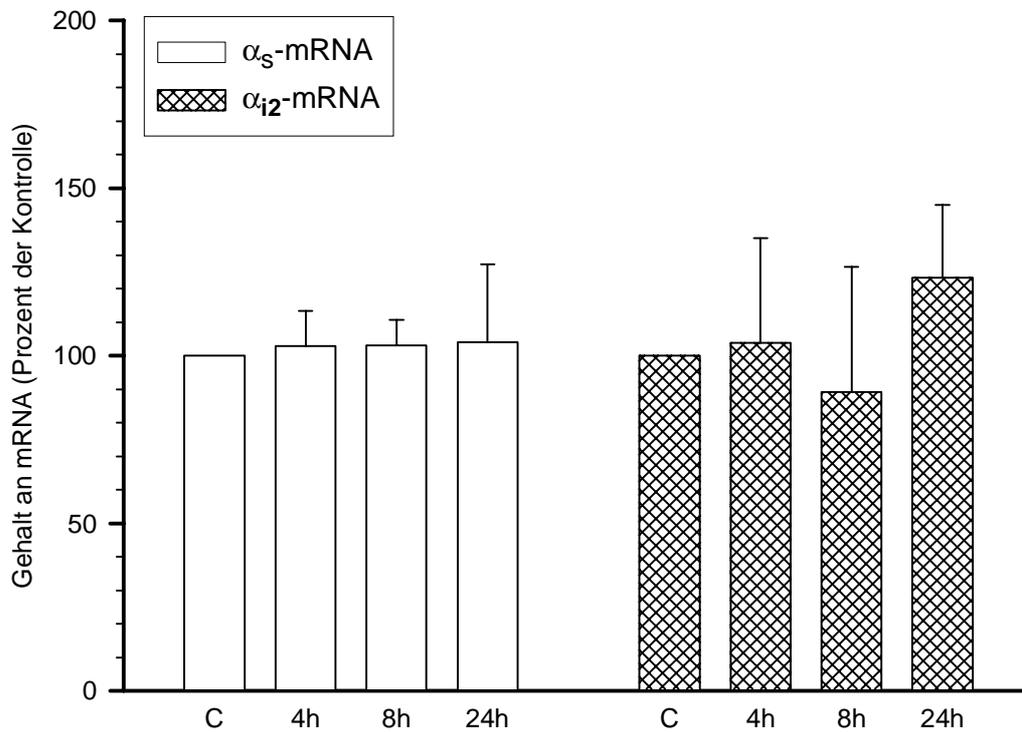


Abb. 4.5 Zeitabhängiger Einfluß von Isoprenalin auf den Gehalt an α_5 - und α_{12} -mRNA
 INS-1 Zellen wurden 4, 8 oder 24 h mit Isoprenalin (10 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Als Kontrolle (C) dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E. der G-Protein-mRNA bezogen auf den internen Standard β -Actin-mRNA aus 3-4 Versuchen; Multifaktor ANOVA.

UK 14.304 ist ein selektiver α_2 -Agonist. Der α_5 -mRNA Spiegel sinkt nach Inkubation mit UK 14.304 (1 $\mu\text{mol/l}$) über 4 und 8 h auf 72 % bzw. auf 45 % der Kontrolle, um nach 24 h wieder das Ausgangsniveau zu erreichen (Abb. 4.6). Auch der Gehalt an α_{12} -mRNA ist nach 4 und 8 h deutlich auf 60 % bzw. 73 % erniedrigt, aber wieder zeigt sich nach 24 h ein Anstieg auf 144 % der Kontrolle.

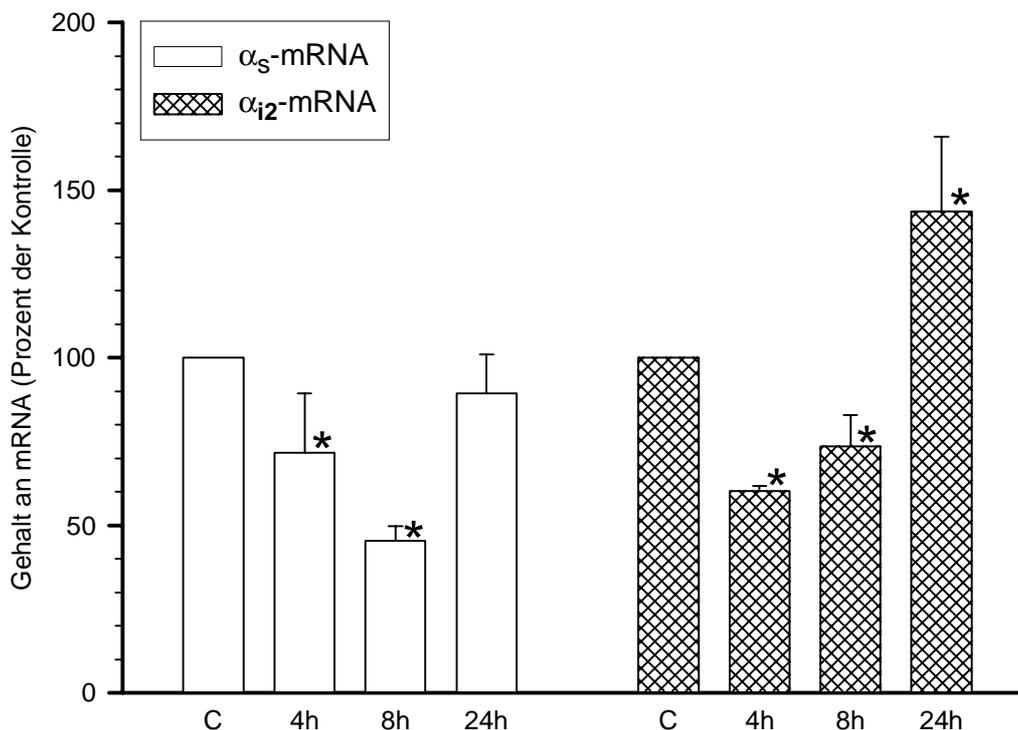


Abb. 4.6 Zeitabhängiger Einfluß von UK 14.304 auf den Gehalt an α_S - und α_{i2} -mRNA
 INS-1 Zellen wurden 4, 8 oder 24 h mit UK 14.304 (1 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Als Kontrolle (C) dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E. der G-Protein-mRNA bezogen auf den internen Standard β -Actin-mRNA aus 3-5 Versuchen; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Multifaktor ANOVA.

Die Effekte gleichen denen, die nach Inkubation mit Adrenalin zu beobachten sind. Die Adrenalinwirkung scheint also über α_2 -Adrenozeptoren vermittelt zu sein.

4.2.2 Regulation durch Modulatoren der Insulinsekretion

Adrenalin und UK 14.304 hemmen die Insulinsekretion über α_2 -Adrenozeptoren (Metz et al., 1978; John et al., 1990). In weiteren Versuchen sollte gezeigt werden, ob Substanzen, die die Insulinsekretion steigern, ebenfalls einen Einfluß auf den Gehalt an α_S - und α_{i2} -mRNA ausüben.

Die beiden Darmhormone *gastric inhibitory polypeptide* (GIP) und *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) wirken insulinotrop (Kap. 1.2.3). Die Inkubation mit GIP (10 nmol/l) führt nach 8 h

zu einem Anstieg der α_5 - und α_{i2} -mRNA Spiegel auf 131 % bzw. 182 % (Abb. 4.7). Nach 24 h besteht kein signifikanter Unterschied mehr zur Kontrolle. Der mRNA-Gehalt erreicht wieder den Basalwert.

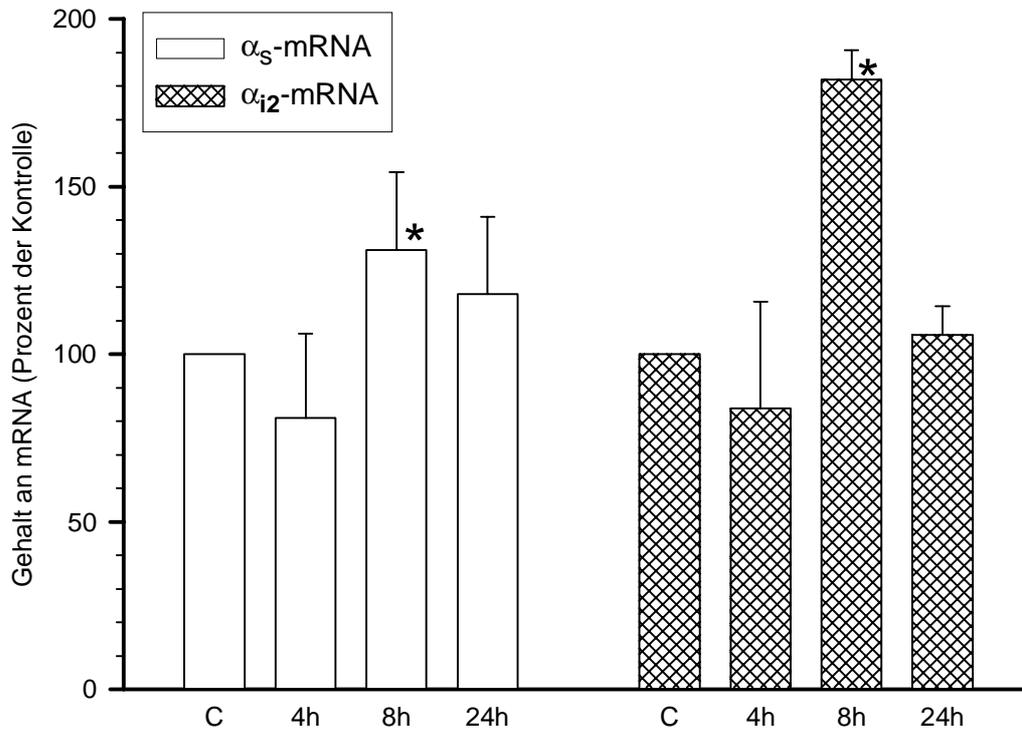


Abb. 4.7 Zeitabhängiger Einfluß von GIP auf den Gehalt an α_5 - und α_{i2} -mRNA

INS-1 Zellen wurden 4, 8 oder 24 h mit GIP (10 nmol/l) inkubiert. Als Kontrolle (C) dienen unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E. der G-Protein-mRNA bezogen auf den internen Standard β -Actin-mRNA aus 3-5 Versuchen; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Multifaktor ANOVA.

Nach achtstündiger Inkubation mit GLP-1 (10 nmol/l) steigt der Gehalt an α_{i2} -mRNA auf 137 % an, um nach 24 h wieder auf das Ausgangsniveau zu erreichen (Abb. 4.8). Der α_5 -mRNA Spiegel dagegen ist schon nach 4 h signifikant auf 136 % erhöht und bleibt über den gesamten untersuchten Zeitraum auf diesem erhöhten Niveau. Nach achtstündiger Inkubation beträgt er noch 129 % und nach 24 h 124 % der unbehandelten Kontrollzellen.

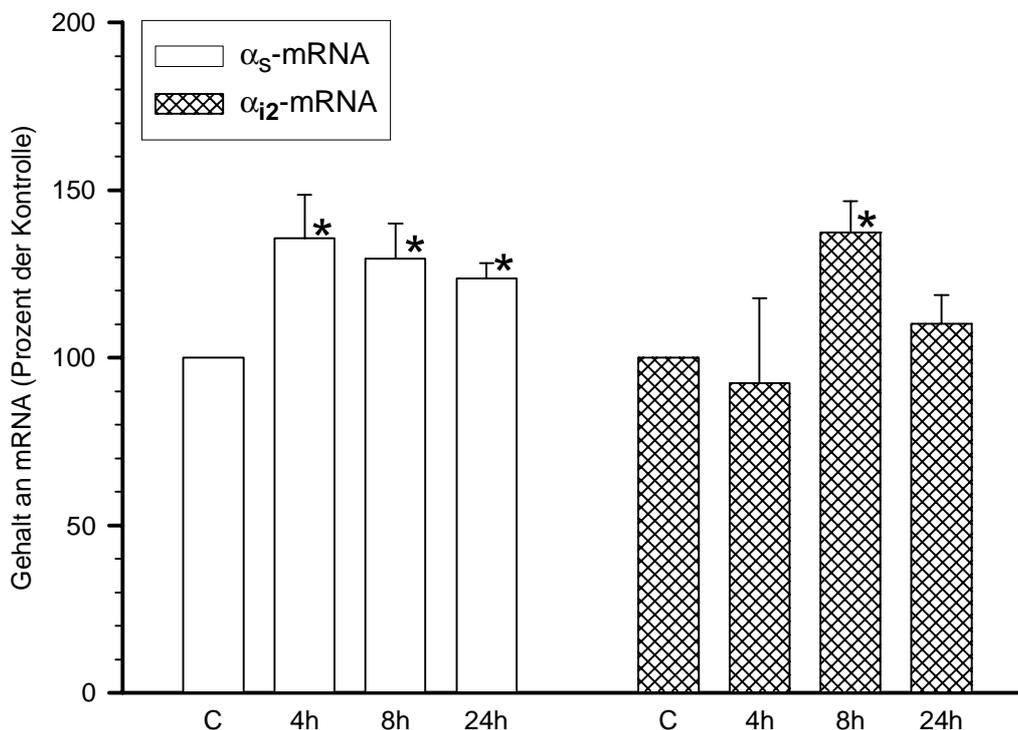


Abb. 4.8 Zeitabhängiger Einfluß von GLP-1 auf den Gehalt an α_S - und α_{I2} -mRNA

INS-1 Zellen wurden 4, 8 oder 24 h mit GLP-1 (10 nmol/l) inkubiert. Als Kontrolle (C) dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E. der G-Protein-mRNA bezogen auf den internen Standard β -Actin-mRNA aus 3-4 Versuchen; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Multifaktor ANOVA.

Um zu zeigen, ob die nach Inkubation mit Adrenalin und UK 14.304 beobachtete Regulation der mRNA spezifisch für α_2 -Agonisten ist oder ob auch andere Hemmstoffe der Insulinsekretion ähnliche Effekte hervorrufen, wurde die Wirkung von Galanin auf die α_S - und α_{I2} -mRNA untersucht. Da die vorherigen Untersuchungen zeigen, daß der stärkste Einfluß auf die mRNA-Spiegel nach einer Inkubation über 8 h ausgeübt wird, wird in den weiteren Versuchen nur die Regulation nach einer achtstündigen Inkubation untersucht.

Galanin (50 nmol/l) führt nach einer Inkubationsdauer von 8 h zu einer Abnahme des α_S - und α_{I2} -mRNA Gehalts auf 57 % bzw. 84 % (Abb. 4.9). Damit wird deutlich, daß die Herunterregulierung der mRNA nicht allein auf einen Angriff an α_2 -Adrenozeptoren

zurückgeführt werden kann, sondern auf Änderungen in gemeinsam genutzten *second messenger* Systemen der Zelle beruht.

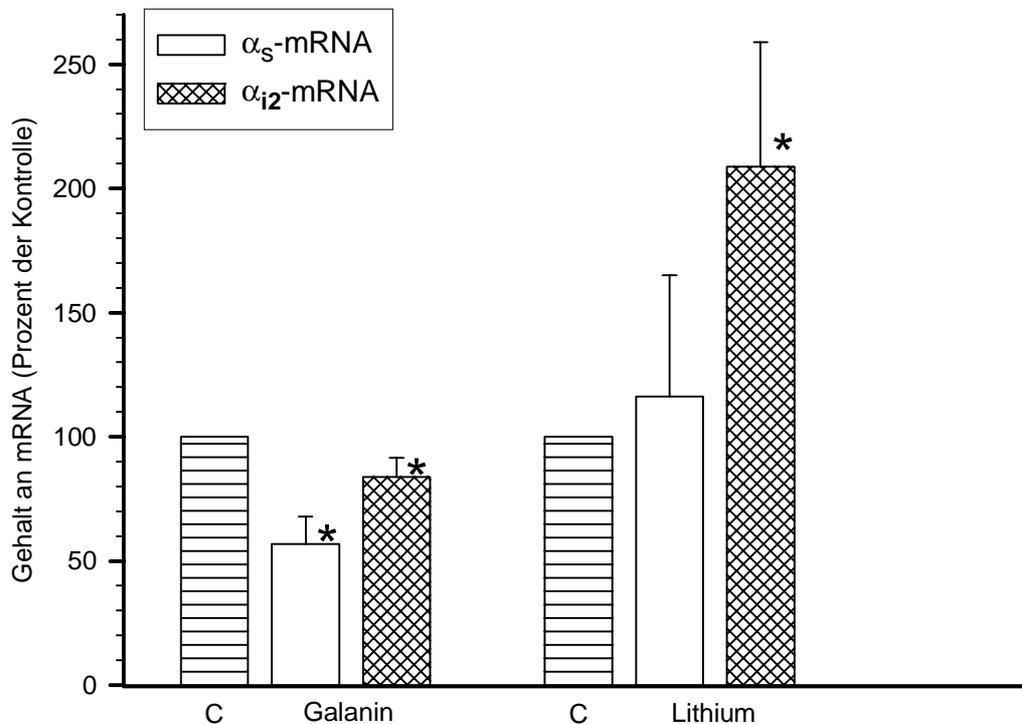


Abb. 4.9 Einfluß von Galanin und Lithium auf den Gehalt an α_S - und α_{I2} -mRNA

INS-1 Zellen wurden 8 h mit Galanin (50 nmol/l) oder Lithium (10 mmol/l) inkubiert. Als Kontrolle (C) dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E. der G-Protein-mRNA bezogen auf den internen Standard β -Actin-mRNA aus 3-4 Versuchen; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, Multifaktor ANOVA.

Die bisher eingesetzten Substanzen sind Agonisten an G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Um auszuschließen, daß Regulationen auf Rezeptorebene Einfluß auf die G-Protein-mRNA ausüben können, sollte eine Substanz getestet werden, deren Angriffspunkt direkt in der Zelle liegt. Deshalb wurden INS-1 Zellen über 8 h mit Lithium (10 mmol/l) inkubiert. Lithium bewirkt einen starken Anstieg des α_{I2} -mRNA Gehalts auf 209 %, während die Menge an α_S -mRNA im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht signifikant verändert ist (Abb. 4.9). Der Einfluß von Lithium auf den Gehalt an α_{I2} -mRNA macht wahrscheinlich, daß

Veränderungen im *second messenger* System der Zelle der mRNA-Regulation zugrunde liegen.

4.2.3 Einfluß von Verapamil auf die Regulation der mRNA

Ein wichtiger *second messenger*, der auch besonders für die Insulinsekretion von Bedeutung ist, ist Ca^{2+} genauer die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Durch weitere Versuche sollte die Frage geklärt werden, ob ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum und die daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an der Regulation der α_s - und α_{i2} -mRNA beteiligt sind.

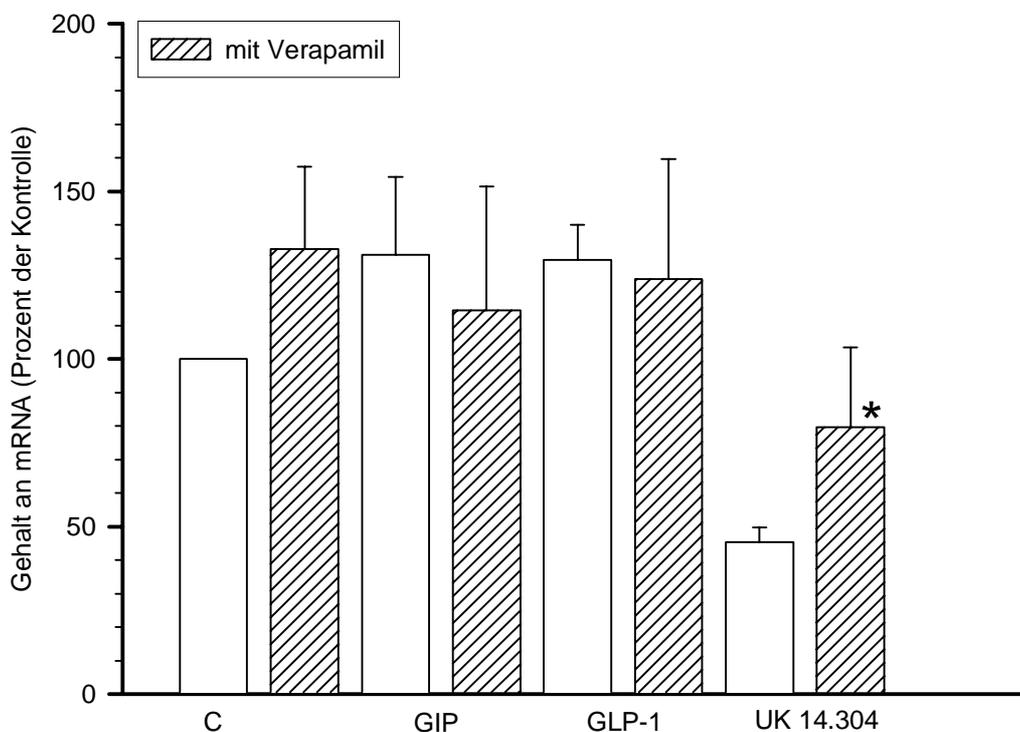


Abb. 4.10 Einfluß von Verapamil auf den Gehalt an α_s -mRNA

INS-1 Zellen wurden 8 h mit GIP (10 nmol/l), GLP-1 (10 nmol/l), UK 14.304 (1 $\mu\text{mol/l}$) und/oder Verapamil (50 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Als Kontrolle (C) dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E. der G-Protein-mRNA bezogen auf den internen Standard β -Actin-mRNA aus 3-5 Versuchen; * $p < 0,05$ vs. ohne Verapamil; Multifaktor ANOVA.

Eingesetzt wurde der Ca^{2+} -Kanalblocker Verapamil (50 $\mu\text{mol/l}$). INS-1 Zellen wurden über 8 h mit Verapamil alleine inkubiert oder mit einer Kombination aus Verapamil mit GIP (10 nmol/l), GLP-1 (10 nmol/l) oder UK 14.304 (1 $\mu\text{mol/l}$). Verapamil hat keinen signifikanten Einfluß auf den Gehalt an α_s -mRNA (Abb. 4.10). Verapamil hat auch bei der Inkubation in Kombination mit GIP, GLP-1 oder UK 14.304 keinen Einfluß auf die α_s -mRNA. Die Spiegel unterscheiden sich weder von denen in unbehandelten Zellen, noch von den α_s -mRNA Mengen, die nach Inkubation mit GIP oder GLP-1 alleine resultieren.

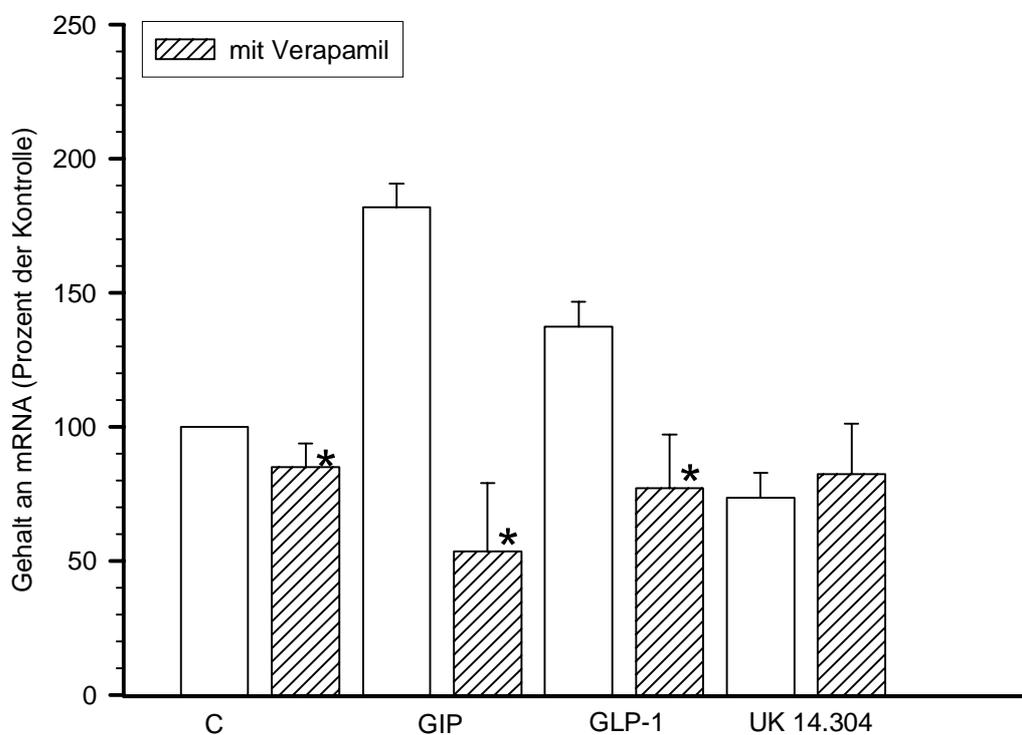


Abb. 4.11 Einfluß von Verapamil auf den Gehalt an α_2 -mRNA

INS-1 Zellen wurden 8 h mit GIP (10 nmol/l), GLP-1 (10 nmol/l), UK 14.304 (1 $\mu\text{mol/l}$) und/oder Verapamil (50 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Als Kontrolle (C) dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E. der G-Protein-mRNA bezogen auf den internen Standard β -Actin-mRNA aus 3-5 Versuchen; * $p < 0,05$ vs. ohne Verapamil; Multifaktor ANOVA.

Einen deutlichen Effekt hat Verapamil auf die α_{i2} -mRNA. In Abb. 4.11 sieht man, daß Verapamil alleine zu einer Abnahme des Gehalts an α_{i2} -mRNA auf 85 % führt. Eine

Inkubation mit GIP oder GLP-1 führt zu einem Anstieg des α_{i2} -mRNA Spiegels auf 182 % bzw. 137 %. Durch Behandlung der Zellen mit GIP bzw. GLP-1 in Kombination mit Verapamil kommt es dagegen zu einer Abnahme des Gehalts an α_{i2} -mRNA auf 54 % bzw. 77 %. Da eine Inkubation mit UK 14.304 alleine schon eine Verringerung der α_{i2} -mRNA Spiegel auf 73 % hervorruft, hat eine Kombination von UK 14.304 mit Verapamil keinen darüber hinaus gehenden Effekt. Der Gehalt an α_{i2} -mRNA bleibt auf 82 % gesenkt.

Der Ca^{2+} -Kanalblocker Verapamil verhindert den durch GIP bzw. GLP-1 hervorgerufenen Anstieg der α_{i2} -mRNA Menge. Das Ansteigen des Gehalts an α_{i2} -mRNA ist also abhängig von einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen und der daraus resultierenden Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

4.3 Einfluß einer Vorinkubation auf die Insulinsekretion

Wie im Kapitel 4.2 gezeigt wurde, bewirkt eine Vorinkubation der INS-1 Zellen über 8 h mit GIP, GLP-1, UK 14.304, Galanin oder Lithium eine Regulation der α_S - und α_{i2} -mRNA. Die Inkretinhormone führen zu einem Anstieg der α_S - und α_{i2} -mRNA Spiegel, während der α_2 -Adrenozeptoragonist UK 14.304 und Galanin den Gehalt an α_S - und α_{i2} -mRNA senken. Lithium ruft einen Anstieg des Gehalts an α_{i2} -mRNA hervor, hat aber keinen Effekt auf die α_S -mRNA. Die folgenden Versuche sollten zeigen, ob die achtstündige Vorinkubation mit den oben genannten Agonisten parallel zu den Änderungen bestimmter mRNA-Mengen auch die Insulinsekretion beeinflusst.

Stimulation	Vorinkubation (8 h)					
	ohne	GIP	GLP-1	UK 14.304	Galanin	Lithium
GLP-1	X	X		X		
GIP	X		X	X	X	X
UK 14.304	X	X	X		X	X
Galanin	X		X	X		X
Lithium	X	X			X	
Glucose	X	X	X	X	X	X

Tab. 4.1 Kombination von Vorinkubation und akuter Stimulation

INS-1 Zellen werden über 8 h vorinkubiert. Nach Auswaschen der angegebenen Substanz erfolgen Sekretionsversuche, bei denen über 90 min mit den in der ersten Spalte aufgelisteten Substanzen stimuliert wird.

INS-1 Zellen wurden über 8 h mit GIP (10 nmol/l), GLP-1 (10 nmol/l), UK 14.304 (1 μ mol/l), Galanin (50 nmol/l) oder Lithium (10 mmol/l) vorinkubiert. Im Sekretionsversuch wurden die vorinkubierten Zellen über 90 Minuten stimuliert. Die Tabelle zeigt die Kombination der Substanzen bei Vorinkubation und akuter Stimulation.

Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne Vorbehandlung mit 3,0 mmol/l Glucose oder 8,3 mmol/l Glucose stimuliert wurden.

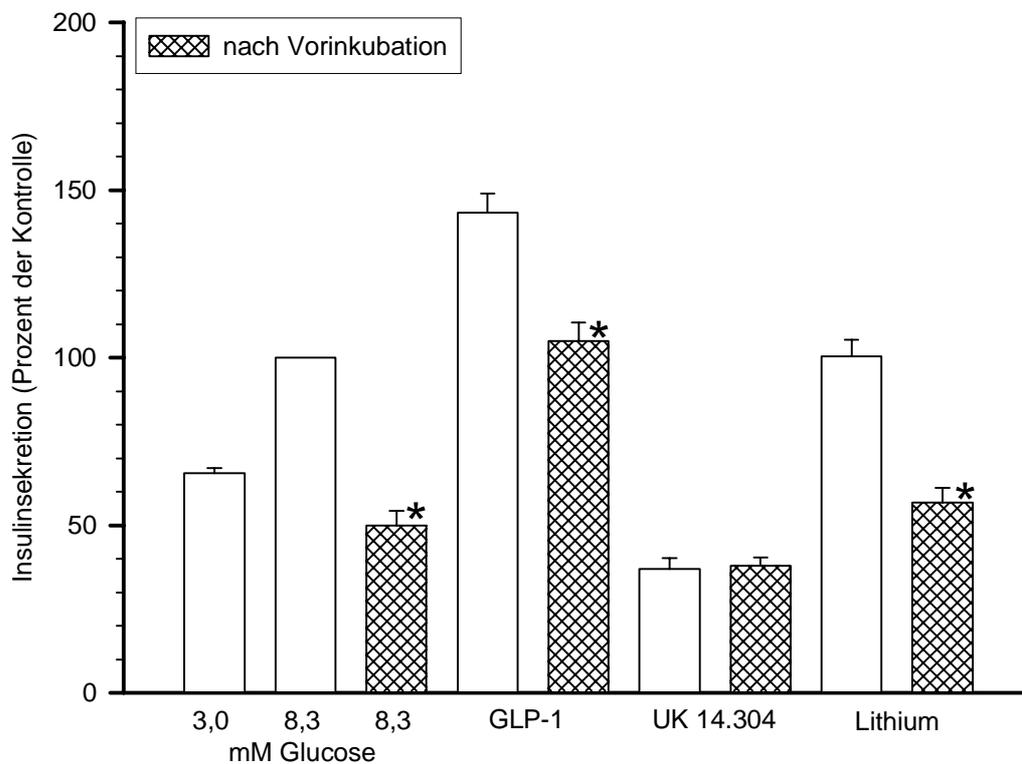


Abb. 4.12 Einfluß einer Vorinkubation mit GIP auf die Insulinsekretion

INS-1 Zellen wurden 8 h mit GIP (10 nmol/l) vorinkubiert. Die Insulinsekretion wurde nach 90 min Stimulation mit GLP-1 (10 nmol/l), UK 14.304 (1 μ mol/l) oder Lithium (10 mmol/l) in KRH-Puffer ermittelt. Die Insulinsekretion bei 8,3 mmol/l Glucose ist als 100 % definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus 3 Versuchen; * $p < 0,05$ vs. ohne Vorinkubation; Multifaktor ANOVA.

Abb. 4.12 zeigt den Einfluß einer Vorinkubation mit GIP. Die Glucose-induzierte Insulinsekretion wird auf 50 % gesenkt. GLP-1 führt ohne Vorinkubation zu einer Steigerung der Insulinsekretion auf 143 %. Die Vorinkubation mit GIP verhindert die Wirkung von

GLP-1, so daß GLP-1 nur noch eine Insulinsekretion von 105 % hervorruft, die sich nicht mehr signifikant von der Sekretion unbehandelter Zellen unterscheidet. UK 14.304 senkt die Insulinsekretion auf 37 % der Kontrolle. Durch Vorbehandlung mit GIP wird der Effekt von UK 14.304 nicht verändert. Lithium hat keinen Einfluß auf die Insulinsekretion von INS-1 Zellen. Die Vorinkubation mit GIP bewirkt, daß die Insulinsekretion nach Stimulation mit Lithium auf 57 % abnimmt.

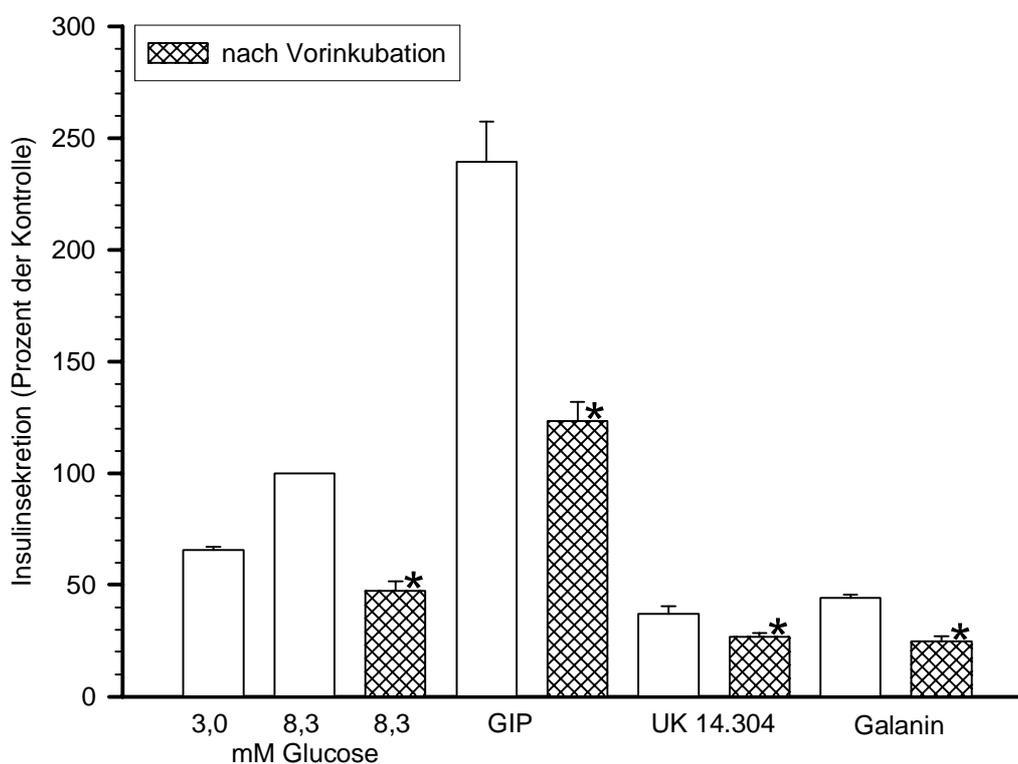


Abb. 4.13 Einfluß einer Vorinkubation mit GLP-1 auf die Insulinsekretion

INS-1 Zellen wurden 8 h mit GLP-1 (10 nmol/l) vorinkubiert. Die Insulinsekretion wurde nach 90 min Stimulation mit GIP (10 nmol/l), UK 14.304 (1 μ mol/l) oder Galanin (50 nmol/l) in KRH-Puffer ermittelt. Die Insulinsekretion bei 8,3 mmol/l Glucose ist als 100 % definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus 3 Versuchen; * $p < 0,05$ vs. ohne Vorinkubation; Multifaktor ANOVA.

Die Wirkung einer Vorinkubation mit GLP-1 entspricht den Effekten, die auch die GIP-Vorbehandlung hervorruft (Abb. 4.13). GIP führt ohne Vorinkubation zu einer Steigerung der Insulinsekretion auf 239 %. Die Vorinkubation mit GLP-1 bewirkt, daß diese Steigerung

weniger stark ausgeprägt ist und nach Stimulation mit GIP nur noch 123 % beträgt. Die Hemmung der Insulinsekretion durch UK 14.304 wird durch Vorinkubation mit GLP-1 noch verstärkt. Die Insulinsekretion sinkt auf 27 % der Kontrolle. Ohne Vorbehandlung hemmt Galanin die Insulinsekretion, so daß sie 44 % der Kontrolle beträgt. Auch in diesem Fall verstärkt die Vorinkubation mit GLP-1 die Hemmung der Insulinsekretion auf 25 %. Die Glucose-induzierte Insulinsekretion verringert sich auf 47 %.

Eine Vorinkubation mit den Inkretinhormonen GIP und GLP-1 führt zu einer Verminderung von Glucose-induzierter und durch Agonisten hervorgerufener Insulinsekretion.

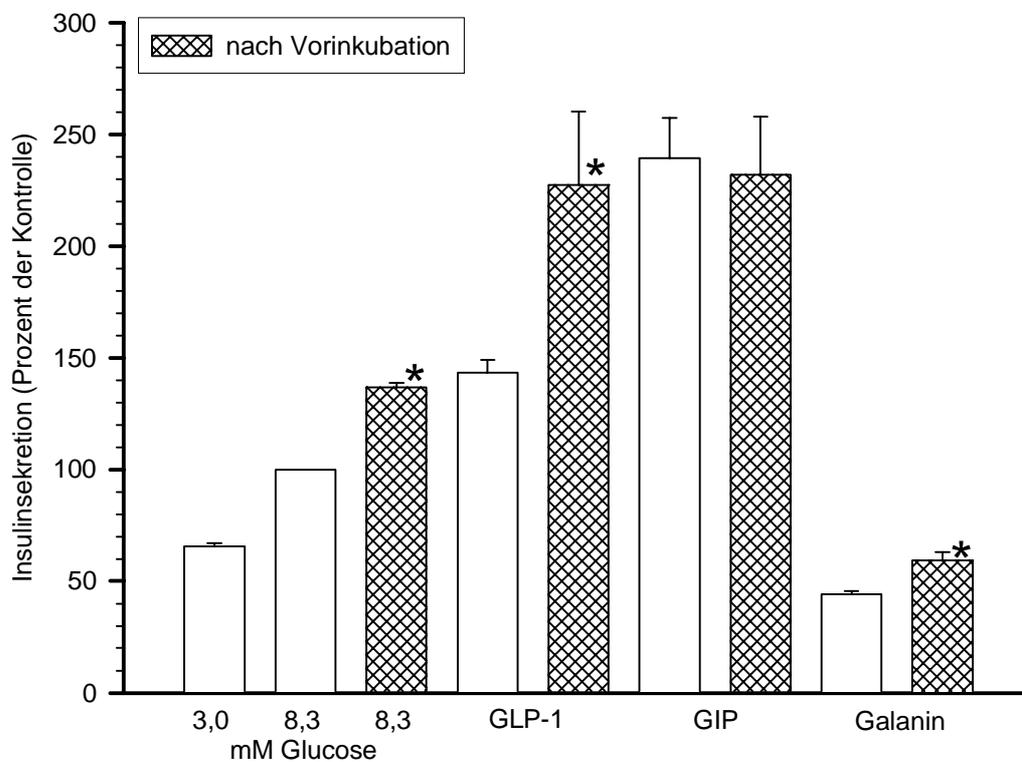


Abb. 4.14 Einfluß einer Vorinkubation mit UK 14.304 auf die Insulinsekretion

INS-1 Zellen wurden 8 h mit UK 14.304 (1 $\mu\text{mol/l}$) vorinkubiert. Die Insulinsekretion wurde nach 90 min Stimulation mit GLP-1 (10 nmol/l), GIP (10 nmol/l) oder Galanin (50 nmol/l) in KRH-Puffer ermittelt. Die Insulinsekretion bei 8,3 mmol/l Glucose ist als 100 % definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. aus 3-4 Versuchen; * $p < 0,05$ vs. ohne Vorinkubation; Multifaktor ANOVA.

Genau den gegenteiligen Effekt beobachtet man nach Vorbehandlung der Zellen mit UK 14.304 bzw. Galanin. Die Glucose-induzierte Insulinsekretion erhöht sich nach Vorinkubation mit UK 14.304 auf 137 %. Die durch GLP-1 schon erhöhte Insulinsekretion steigt nach Vorbehandlung der Zellen mit UK 14.304 noch weiter auf 227 % (Abb. 4.14). Die Insulinsekretion nach Stimulation mit GIP bleibt bei 232 %. Die Hemmung der Insulinsekretion durch Galanin ist nach Vorinkubation mit UK 14.304 weniger stark ausgeprägt und beträgt 59 % der Kontrolle.

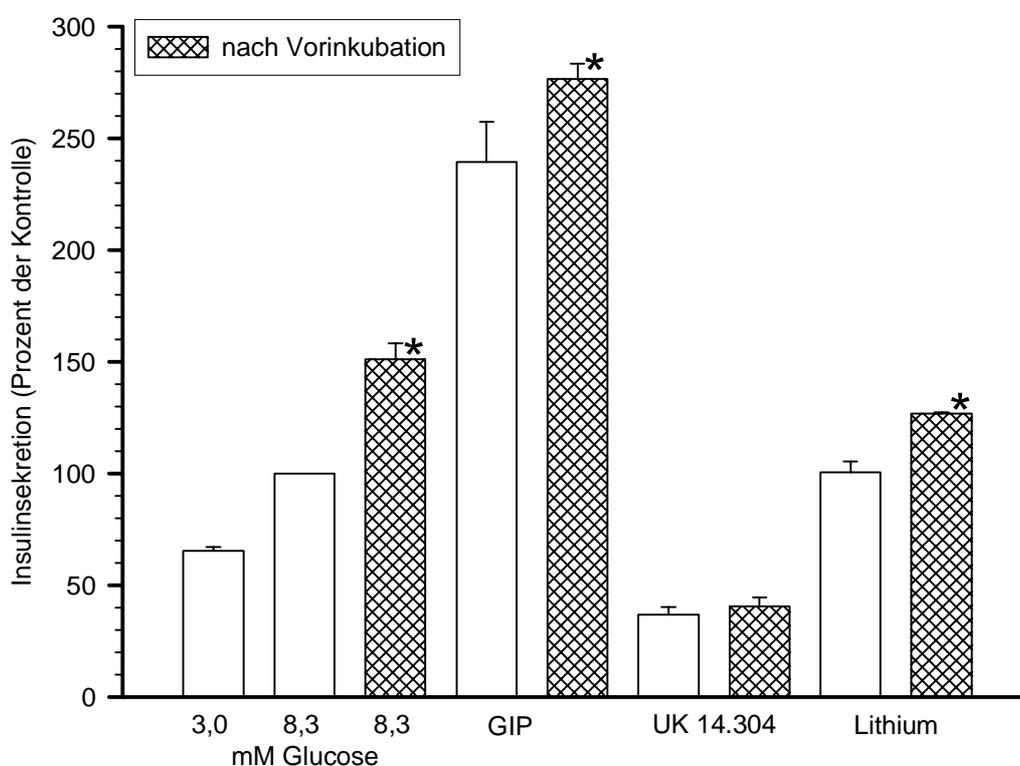


Abb. 4.15 Einfluß einer Vorinkubation mit Galanin auf die Insulinsekretion

*INS-1 Zellen wurden 8 h mit Galanin (50 nmol/l) vorinkubiert. Die Insulinsekretion wurde nach 90 min Stimulation mit GIP (10 nmol/l), UK 14.304 (1 µmol/l) oder Lithium (10 mmol/l) in KRH-Puffer ermittelt. Die Insulinsekretion bei 8,3 mmol/l Glucose ist als 100 % definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus 3 Versuchen; * $p < 0,05$ vs. ohne Vorinkubation; Multifaktor ANOVA.*

Der Einfluß einer Vorinkubation mit Galanin entspricht den Effekten, die sich nach Vorbehandlung mit UK 14.304 zeigen. Die Glucose-induzierte Insulinsekretion steigt auf

151 % im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen (Abb. 4.15). Auch die Insulinsekretion nach Stimulation mit GIP ist durch Galanin-Vorinkubation auf 277 % erhöht. Die Hemmung der Insulinsekretion durch UK 14.304 bleibt bei 41 %. Die durch Lithium hervorgerufene Insulinsekretion steigt durch Vorbehandlung mit Galanin auf 127 %.

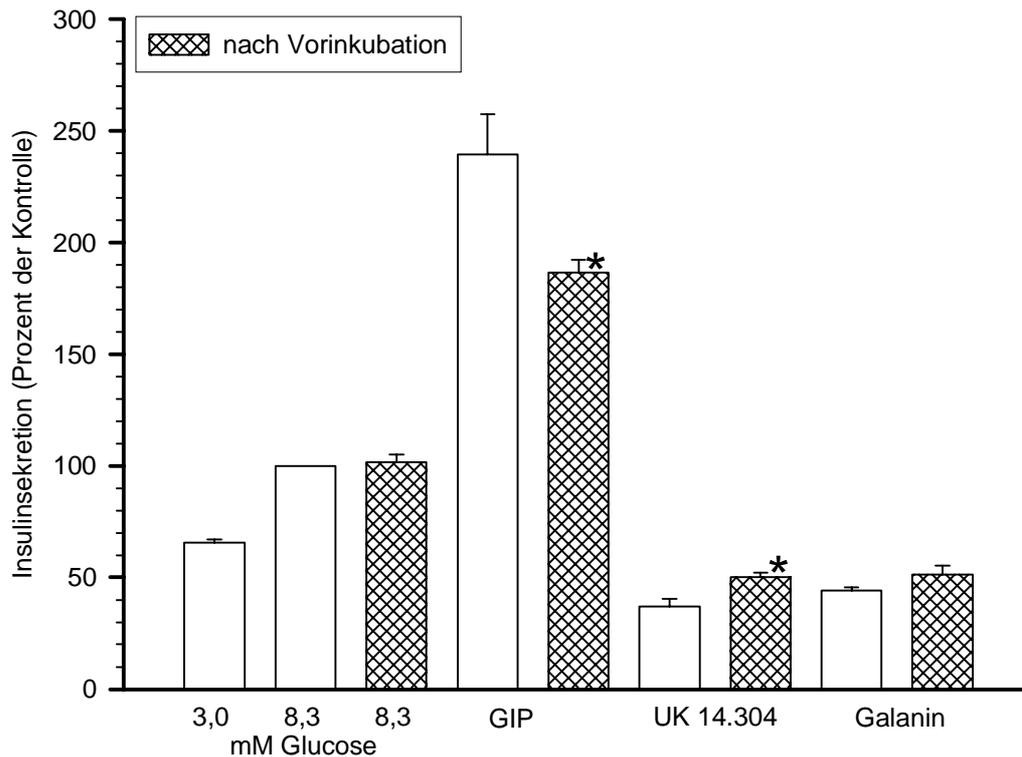


Abb. 4.16 Einfluß einer Vorinkubation mit Lithium auf die Insulinsekretion

*INS-1 Zellen wurden 8 h mit Lithium (10 mmol/l) vorinkubiert. Die Insulinsekretion wurde nach 90 min Stimulation mit GIP (10 nmol/l), UK 14.304 (1 µmol/l) oder Galanin (50 nmol/l) in KRH-Puffer ermittelt. Die Insulinsekretion bei 8,3 mmol/l Glucose ist als 100 % definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. aus 3 Versuchen; * $p < 0,05$ vs. ohne Vorinkubation; Multifaktor ANOVA.*

Obwohl Lithium selbst keinen Effekt auf die Insulinsekretion zeigt, beeinflusst eine Vorinkubation mit Lithium die Agonist-induzierte Insulinsekretion (Abb. 4.16). Die Glucose-induzierte Insulinsekretion wird nicht verändert. Eine Vorinkubation mit Lithium verringert die durch GIP hervorgerufene Steigerung der Insulinsekretion von 239 % auf 186 %. Die Hemmung der Insulinsekretion durch Stimulation mit UK 14.304 bzw. Galanin ist nach

Vorbehandlung mit Lithium weniger stark ausgeprägt. UK 14.304 senkt in diesem Fall die Insulinsekretion noch auf 50 %. Die Hemmung der Insulinsekretion durch Galanin beträgt nach Vorinkubation mit Lithium noch 51 %.

5 DISKUSSION

5.1 Vorkommen von G-Proteinen in insulinsezernierenden Zellen

G-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion der durch Neurotransmitter oder Hormone vermittelten Modulation der Insulinsekretion. Die Beteiligung von Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen an der Insulinsekretion wurde erstmalig 1979 von Katada und Ui nachgewiesen. Sie konnten zeigen, daß Pertussistoxin die Hemmung der Insulinsekretion durch Adrenalin verhindern kann. Es wurden weitere Untersuchungen durchgeführt um herauszufinden, welche G-Protein- α -Untereinheiten in insulinsezernierenden Zellen vorkommen.

Das Vorhandensein von G_s konnte durch Choleratoxin-vermittelte ADP-Ribosylierung an Langerhansschen Inseln der Ratte gezeigt werden (Svoboda et al., 1985). Zwei $G\alpha_s$ -Isoformen wurden in HIT-Zellen von Walseth et al. (1989) durch $G\alpha_s$ -Antikörper nachgewiesen.

Terashima et al. identifizierten 1987 mit Hilfe eines spezifischen Antiserums $G\alpha_o$ in Langerhansschen Inseln der Ratte. Durch Pertussistoxin-vermittelte ADP-Ribosylierung konnten Persaud et al. (1989) ein Protein mit einem Molekulargewicht von 41 kDa nachweisen, bei dem es sich um G_i handelte. Durch den Einsatz spezifischer Antiseren zeigten Berrow et al. 1992, daß $G\alpha_{i2}$ und zwei Formen von $G\alpha_o$ vorhanden sind. Der $G\alpha_{i1}$ -Spiegel lag unterhalb der Detektionsgrenze. Zigman et al. (1994) untersuchten die Expression der G-Protein- α -Untereinheiten in Inseln aus Mäusepankreas. Sie benutzten degenerierte Oligonukleotidprimer in einer RT-Polymerasekettenreaktion (Kap. 3.3), klonierten die amplifizierten cDNA-Fragmente und sequenzierten sie. Damit wurde durch den Nachweis der mRNA das Vorhandensein von α_s und α_{i2} bestätigt. Außerdem wurden α_{i1} oder α_{i3} , α_{i11} , α_{i14} , α_z und α_{i2} gefunden. Interessant ist hierbei vor allem der Nachweis von α_z und α_{i2} , da frühere Untersuchungen darauf hingewiesen haben, daß α_z hauptsächlich in Gehirn, Netzhaut und Nebenniere vorkommt und α_{i2} vorwiegend in den Sehstäbchen des Auges exprimiert wird. Diese an ganzen Inseln durchgeführten Versuche wurden ergänzt durch die Untersuchungen von aus Ratteninseln isolierten β -Zellen (Skoglund et al., 1995). Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurde in β -Zellen das Vorkommen von $G\alpha_s$, $G\alpha_{i1-3}$, $G\alpha_o$ und $G\alpha_q$ nachgewiesen. Daneben fand man ebenfalls $G\alpha_z$, $G\alpha_{i2}$ und auch $G\alpha_{olf}$. $G\alpha_{o2}$ und $G\alpha_{i11}$ konnten nicht nachgewiesen werden.

Entsprechende Untersuchungen wurden auch an insulinsezernierenden Zellkulturen durchgeführt. Seaquist et al. (1992) wiesen in HIT-T15-Zellen $G\alpha_{i1-3}$ und $G\alpha_o$ im Immunoblot nach und Kowluru et al. (1994) zeigten das Vorhandensein von drei Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen an Zellmembranen von HIT-Zellen. In RINm5F-Zellen wurden $G\alpha_{i1-3}$ und zwei Formen von $G\alpha_o$ gefunden (Cormont et al., 1991). DeMazancourt et al. (1994) benutzten Antisense-Oligonukleotide, um den Gehalt an $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_o$ zu senken. $G\alpha_{i1}$ konnten sie in RINm5F-Zellen nicht nachweisen. Zum gleichen Ergebnis kamen Remaury und Paris (1992) mittels Immunodetektion. Dagegen konnten Schmidt et al. (1991) mittels spezifischer Antikörper $G\alpha_o$, $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i2}$, nicht aber $G\alpha_{i3}$ identifizieren. Eine Zusammenstellung der zum Teil widersprüchlichen Befunde zeigt die folgende Tabelle.

Zellen	α_s	α_{i1}	α_{i2}	α_{i3}	α_o	Sonstige	Literatur
Inseln der Ratte	+						Svoboda et al., 1985
Inseln der Ratte					+		Terashima et al., 1987
Inseln der Ratte		-	+		+		Berrow et al., 1992
Inseln der Maus	+	+/ α_{i3}	+	+/ α_{i1}		α_{i1} , α_{i4} , α_z , α_{i2}	Zigman et al., 1994
Ratten-B-Zellen	+	+	+	+	-	α_q , α_{olf} , α_z , α_{i2}	Skoglund et al., 1995
HIT-T15	+						Walseth et al., 1989
HIT-T15		+	+	+	+		Seaquist et al., 1992
RINm5F		+	+	+	+		Cormont et al., 1991
RINm5F		-	+	+	+		DeMazancourt et al., 1994
RINm5F			+	+	+		Remaury und Paris, 1992
RINm5F		+	+	-	+		Schmidt et al., 1991

Tab. 5.1 Vorkommen von G-Proteinen in insulinsezernierenden Zellen

Nach der Entdeckung der ersten G-Proteine nahm man zuerst an, bestimmte G-Proteine würden nur in wenigen Zelltypen vorkommen, z. B. schien $G\alpha_{i1}$ nur in Gehirn und Nervenzellen nachweisbar zu sein. Durch Anwendung von Techniken wie der RT-PCR gelang später die Detektion verschiedener G-Proteine in vielen Organen. In dieser Arbeit wurden α_s -, α_{i1-3} - und α_o -mRNA in INS-1 Zellen nachgewiesen. Dieses Ergebnis steht somit

im Einklang mit den oben zitierten Untersuchungen in β -Zellen bzw. in anderen insulinsezernierenden Zelllinien.

5.2 Regulation der α_s - und α_{i2} -mRNA

5.2.1 Identifizierung des für die Regulation verantwortlichen Adrenozeptors

Verschiedene Arbeiten zeigen den Einfluß von Adrenozeptoragonisten auf die Regulation der mRNA von G-Protein- α -Untereinheiten. Hadcock et al. (1990) untersuchten die Wirkung einer Inkubation über 24 h mit dem β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin an S49 Lymphomazellen. Der Gehalt an α_{i2} -mRNA steigt nach 12 h um das Vierfache an und erreicht nach 24 h wieder das Kontrollniveau. Der α_s -mRNA Spiegel steigt dagegen kurzfristig um 25 % an, sinkt aber bei länger andauernder Inkubation (18 h) auf 75 % der Kontrolle. Weitere Untersuchungen befassen sich mit der Regulation der mRNA am Herzen. Eschenhagen et al. (1991) fanden nach chronischer Infusion von Isoprenalin über vier Tage bei Ratten ebenfalls einen Anstieg der α_{i2} -mRNA um 49 % im Myocard. Die Menge an α_s -mRNA bleibt unverändert. Mittels *nuclear run-on assay* zeigten sie (Müller et al. 1993), daß der Anstieg der α_{i2} -mRNA auf einer gesteigerten Transkription beruht.

Abweichend von den oben zitierten Organen und Zelllinien wird in dieser Arbeit an INS-1 Zellen gezeigt, daß die Inkubation mit Adrenalin eine Abnahme des Gehalts an α_s - und α_{i2} -mRNA hervorruft. Der Vergleich ist nur eingeschränkt möglich, da Adrenalin auf β - und α -Adrenozeptoren wirkt, während Hadcock et al. und Eschenhagen et al. den reinen β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin einsetzten. An insulinsezernierenden Zellen findet man sowohl β - als auch α_2 -Adrenozeptoren. β -Adrenozeptoren sind G_s -gekoppelt und bewirken bei Bindung eines Agonisten eine Aktivierung der Adenylylcyclase und damit einen Anstieg an cAMP. α_2 -Adrenozeptoren koppeln an G_{i2} und führen darüber zu einer Hemmung der Adenylylcyclase mit nachfolgender Erniedrigung des cAMP-Spiegels.

Als reiner β -Adrenozeptoragonist wird auch in dieser Arbeit Isoprenalin eingesetzt. Isoprenalin hat in INS-1 Zellen keinen Einfluß auf die α_s - und α_{i2} -mRNA. Das deutet darauf hin, daß INS-1 Zellen keine oder nur nicht funktionstüchtige β -Adrenozeptoren besitzen. Zum gleichen Schluß kommen auch Waeber et al. (1993), die zeigten, daß in INS-1 Zellen die Inkubation mit Isoprenalin nicht zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels führt.

Die Stimulation sympathischer Nerven am Pankreas führt zu einer Hemmung der Glucose-induzierten Insulinsekretion (Porte und Williams, 1966; Porte et al., 1973). Dieser Effekt kann durch Noradrenalin oder α_2 -Adrenozeptoragonisten imitiert werden (Metz et al., 1978). Inzwischen werden α_2 -Adrenozeptoren noch in weitere Rezeptorsubtypen eingeteilt. Der Rezeptor, der bei der Ratte für die Hemmung der Insulinsekretion verantwortlich ist, wurde als Subtyp α_{2A} charakterisiert (Niddam et al., 1990). Durch den Einsatz eines α_2 -Adrenozeptoragonisten sollte dessen Einfluß auf die Regulation der mRNA untersucht werden. Das sonst häufig eingesetzte Clonidin weist eine geringe α_2 -Spezifität auf. Es bindet auch an α_1 -Adrenozeptoren und an Imidazolinbindungsstellen, wie Versuche an Inseln nach α_2 -Blockade zeigten (Schulz und Hasselblatt, 1989). Die Imidazolinbindungsstellen von isolierten Inseln oder insulinsezernierenden Zelllinien unterscheiden sich von den in anderen Geweben beschriebenen Subtypen I₁ und I₂ und stellen wahrscheinlich einen neuen Subtyp dar (Chan et al., 1994; Olmos et al., 1994). Das strukturverwandte UK 14.304 ist ein Agonist mit hoher α_2 -Selektivität (Cambridge, 1981). Außerdem hat es keine Affinität zu den Imidazolinbindungsstellen der Langerhansschen Insel (Chan et al., 1994). UK 14.304 führt in INS-1 Zellen nach achtstündiger Inkubation zu einer Abnahme des Gehalts an α_S - und α_{i2} -mRNA. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß Adrenalin neben der Hemmung der Insulinsekretion auch die Regulation der α_S - und α_{i2} -mRNA über den Angriff an α_2 -Adrenozeptoren vermittelt. Damit erklärt sich auch, warum Adrenalin an INS-1 Zellen den genau gegenteiligen Effekt im Vergleich zum Isoprenalin an S49 Lymphomazellen oder Rattenmyocardzellen zeigt: α_2 - und β -Adrenozeptoren haben eine entgegengesetzte Wirkung auf das *second messenger* System der Zelle. Während über β -Adrenozeptoren ein Anstieg des cAMP-Spiegels vermittelt wird, rufen α_2 -Agonisten eine Hemmung der Adenylylcyclase und damit niedrige cAMP-Spiegel hervor. Außerdem führt die Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren zu einer Abnahme des Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle und damit zu einer Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Hsu et al., 1991).

5.2.2 Einfluß der Zeit auf den mRNA-Gehalt

Untersucht wurde auch der zeitliche Verlauf der mRNA-Regulation. Durch Inkubation mit Adrenalin oder UK 14.304 sinkt der Gehalt an α_S -mRNA vorübergehend, um nach 24 h wieder das Ausgangsniveau zu erreichen. Auch der α_{i2} -mRNA Spiegel ist nach achtstündiger Inkubation niedriger als in unbehandelten Zellen. Nach 24 h sieht man aber einen Anstieg auf 150 % bzw. 144 % der Kontrolle. Die Regulation der α_{i2} -mRNA verläuft also biphasisch.

Eine biphasische Regulation der Transkriptionsrate des α_{i2} -Gens wurde auch bereits von Müller et al. (1994) an Myokardzellen nachgewiesen. Im *in vitro* Transkriptionsassay fanden sie nach Inkubation von Ratten mit Isoprenalin über 48 h eine Abnahme der Transkriptionsrate in Zellkernen aus dem Rattenmyokard um 37 % und nach 96 h einen Anstieg um 45 %. Der Anstieg der Transkriptionsrate nach 96 h stimmt gut mit einem von der gleichen Arbeitsgruppe zu diesem Zeitpunkt beobachteten Anstieg des Gehalts an α_{i2} -mRNA überein (Eschenhagen et al., 1992). Die α_{i2} -mRNA Menge sinkt aber, trotz der nachgewiesenen Abnahme der Transkriptionsrate nach 48 h, nicht unter das Kontrollniveau ab. Die Regulation des mRNA-Gehalts verläuft also nicht biphasisch. Die Autoren schließen daraus, daß neben der Regulation der Transkriptionsrate noch andere Mechanismen, zum Beispiel Veränderung der mRNA-Stabilität, die Menge an mRNA kontrollieren. Da es nicht Ziel dieser Arbeit war, die mRNA-Stabilität oder die Transkriptionsgeschwindigkeit zu untersuchen, kann die Ursache der beobachteten biphasischen Regulation des Gehalts der α_{i2} -mRNA nicht näher erläutert werden.

Um das Wechselspiel von inhibitorischen und stimulatorischen Substanzen in Bezug auf die zeitabhängige Regulation der mRNA weitergehend zu untersuchen, wurden als Stimulatoren Inkretinhormone eingesetzt, weil sie eine besondere Bedeutung für die Insulinsekretion besitzen. Inkretine (Creutzfeld, 1979) sind definiert als endokrine Faktoren, die im Gastrointestinaltrakt produziert werden, nach Nahrungsaufnahme freigesetzt werden und in Anwesenheit ausreichend hoher Glucosemengen die Insulinsekretion steigern (Kap. 1.2.3). Die Inkretine *gastric inhibitory polypeptide* (GIP) und *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) benutzen ähnliche Signaltransduktionswege. Beide Hormone aktivieren die Adenylylcyclase und steigern so den cAMP-Gehalt (Amiranoff et al., 1984; Drucker et al., 1987). Außerdem bewirken sie einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und damit eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Lu et al., 1993; Yada et al., 1993; Holz et al., 1993).

Der Einfluß von GIP oder GLP-1 auf die mRNA von G-Protein- α -Untereinheiten wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. In INS-1 Zellen ruft GIP einen transienten Anstieg des Gehalts an α_s - und α_{i2} -mRNA hervor. GLP-1 bewirkt auch eine Steigerung der α_s - und α_{i2} -mRNA Spiegel; die Menge an α_s -mRNA bleibt aber über den gesamten untersuchten Zeitraum erhöht. Neben diesem Unterschied des zeitlichen Verlaufs der mRNA-Regulation unterscheidet sich auch die maximal erreichte Steigerung beider Hormone deutlich. GLP-1 vermehrt den Gehalt an α_{i2} -mRNA auf 137 %, GIP sogar auf 182 %.

Obwohl von GIP und GLP-1 bekannt ist, daß beide die Adenylylcyclaseaktivität steigern und den Ca^{2+} -Einstrom erhöhen, zeigen beide Substanzen doch Unterschiede in ihrer Wirkung. Die beobachteten Maximaleffekte stimmen gut mit der Steigerung der Insulinsekretion an INS-1 Zellen überein. Nach Inkubation mit GLP-1 nimmt die Insulinsekretion auf 143 % zu, nach Inkubation mit GIP auf 239 % (Kap. 4.3). Auch Kloss und Verspohl (1996) zeigten, daß GIP an INS-1 Zellen stärker insulinotrop wirkt als GLP-1. Dies scheint eine Besonderheit der INS-1 Zellen zu sein, denn in anderen Untersuchungen *in vitro* und am Menschen stellte sich GLP-1 als die wirksamere Substanz heraus (Andersen et al., 1990; Nauck et al., 1993). Widmann et al. (1992) wiesen nach, daß INS-1 Zellen nur eine geringe Anzahl an GLP-1-Rezeptoren exprimieren (2.000 Bindungsstellen/Zelle) im Vergleich zu anderen Zelllinien, die 50.000 bis 100.000 Bindungsstellen/Zelle aufweisen. Dies könnte eine Erklärung für die geringe Wirkung von GLP-1 an INS-1 Zellen sein.

Nicht nur GIP und GLP-1, sondern auch UK 14.304 und Adrenalin regulieren die mRNA in Abhängigkeit von der Zeit in unterschiedlichem Ausmaß, so daß eine transiente Erhöhung bzw. Erniedrigung resultiert. Verschiedene Autoren beschreiben einen zeitabhängigen Einfluß von Agonisten auf die mRNA von G-Protein- α -Untereinheiten. In S49 Lymphomazellen erhöht Isoprenalin (1 $\mu\text{mol/l}$) nach 8 und 12 h den Gehalt an α_{i2} -mRNA. Danach sinkt er wieder auf das Kontrollniveau (Hadcock et al., 1990). Die Behandlung von Astrogliazellen über 6 bis 9 h mit Isoprenalin (10 $\mu\text{mol/l}$) führt zu einem Anstieg des α_s -mRNA Spiegels, wobei nach 24 h die Werte wieder denen unbehandelter Zellen entsprechen (Dib et al., 1994). Auch in GH₃ Zellen, einer Prolaktin produzierenden Hypophysenzelllinie, wird der Gehalt an α_s - und α_{i2} -mRNA nach Inkubation mit Thyreoliberin (1 $\mu\text{mol/l}$) oder Vasoaktivem Intestinalen Peptid (1 $\mu\text{mol/l}$) vorübergehend gesteigert (Paulssen et al., 1991).

Es gibt aber auch Untersuchungen, in denen eine konstante Herauf- oder Herunterregulation der mRNA-Spiegel über einen längeren Zeitraum nachgewiesen wurde. Die Infusion von Isoprenalin (2,4 mg/kg/Tag) führt im Rattenmyocard nach drei Tagen zu einem Anstieg des Gehalts an α_{i2} -mRNA, wobei dieser erhöhte Spiegel über die gesamte Behandlungszeit von 26 Tagen erhalten bleibt (Eschenhagen et al., 1992). Auch die in dieser Arbeit beobachtete Zunahme der α_s -mRNA nach Stimulation mit GLP-1 scheint weniger zeitabhängig zu sein. Für eine abschließende Beurteilung ist jedoch der hier untersuchte Zeitraum von 24 h zu kurz.

Die in der Literatur mehrfach beschriebene und auch in dieser Arbeit gezeigte transiente Änderung der mRNA-Menge kann Anzeichen einer erfolgten Gegenregulation sein. Eine mögliche Ursache ist die homologe Desensitivierung des aktivierten Rezeptors. Dies führt zur Verringerung des intrazellulären Signals, das der Auslöser für die Steigerung oder Abnahme des mRNA-Gehalts ist. Die eingetretene Regulation der mRNA wird also mit der Zeit weniger stark ausgeprägt und es stellt sich wieder der Basalwert ein. Besonders gut wurde die Desensitivierung des β -Adrenozeptors untersucht (Übersicht bei Hausdorff et al., 1990). Es zeigte sich, daß man eine kurzfristige und eine langfristige Desensitivierung unterscheiden kann. Die kurzfristige Desensitivierung erfolgt schon nach Agonistexposition von wenigen Minuten und endet direkt mit Beendigung der Rezeptorstimulation. Hervorgerufen wird sie durch die Phosphorylierung des Rezeptors mittels Proteinkinase A oder durch die β -Adrenozeptorkinase β -ARK. Die langfristige Desensitivierung macht sich nach Agonistexposition über mehrere Stunden bis Tage bemerkbar. Auch die Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands nach Ende der Inkubation kann Tage dauern. Verantwortlich für diese langsame Desensitivierung ist eine Abnahme der Anzahl an Rezeptoren.

Bekannt sind auch Desensitivierungen der Rezeptoren für GIP und GLP-1. GLP-1 und GIP (je 100 nmol/l) führen an HIT-T15 Zellen und an perifundierten β -Zellen nach 10 min zu einer homologen Desensitivierung (Fehmann und Habener, 1991). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Widmann et al. (1996), die in β TC3 Zellen nach 15 min eine Rezeptordesensitivierung nachwiesen. Diese schnell erfolgende Desensitivierung kann für die Abnahme des Effekts auf die mRNA nach 24 h nicht von Bedeutung sein. Aber auch eine Desensitivierung nach lang andauernder Inkubation konnte für den GLP-1-Rezeptor nachgewiesen werden. Die Inkubation von β -Zellen über 24 h mit GLP-1 (10 nmol/l) ruft einen Verlust des insulinotropen Effekts durch die homologe Desensitivierung des GLP-1-Rezeptors hervor (Gronau und Brubaker, 1995).

Neben der Desensitivierung des Rezeptors kann auch die Menge intrazellulärer Mediatoren, die für die Regulation der mRNA verantwortlich sind, mit der Zeit abnehmen. Müller et al. (1995) zeigten, daß die mRNA des *cAMP response element binding protein* CREB (Kap. 1.3.1) nach Behandlung von Ratten über vier Tage mit Isoprenalin (2,4 mg/kg/Tag) herunterreguliert wird. CREB spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Transkription verschiedener Gene. Wenn die Menge an CREB nach chronischer Inkubation gesenkt wird, läßt die Stimulation der Transkription nach und der Gehalt an mRNA, der vorher mit Hilfe

von CREB gesteigert war, sinkt wieder ab. So kann eine Regulation der mRNA nur als transiente Mengenänderung erfolgen.

5.2.3 Effekte von Galanin und Lithium

Da die Regulation der mRNA nach achtstündiger Inkubation am stärksten ausgeprägt ist, wurde der Einfluß von Galanin und Lithium nur über diesen Zeitraum untersucht. Galanin ist ein Peptidhormon, das unter anderem von Nervenendigungen in den Langerhansschen Inseln frei gesetzt wird (Dunning et al., 1986). Es wirkt als Inhibitor der Insulinsekretion (McDonald et al., 1985). Man kennt vier Wirkmechanismen, die der Hemmung der Insulinsekretion zugrunde liegen (Kap. 1.2.4.3). Galanin erhöht die Aktivität des ATP-abhängigen K^+ -Kanals und führt so zur Hyperpolarisation der Zelle. Außerdem hemmt es unabhängig von der Hyperpolarisation spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Galanin ist ebenfalls ein Inhibitor der Adenylylcyclase und schließlich kann es über einen noch unbekanntem Effekt die Insulinsekretion unabhängig von den oben genannten Systemen hemmen.

Galanin ähnelt also in seiner Wirkung auf die Signaltransduktionswege dem α_2 -Agonisten UK 14.304. Auch der Einfluß auf den Gehalt an α_s - und α_{i2} -mRNA ist vergleichbar. Wie UK 14.304 führt Galanin zu einer Erniedrigung der α_s - und α_{i2} -mRNA Spiegel. Die Herunterregulierung der mRNA beruht also nicht ausschließlich auf einem Angriff an α_2 -Adrenozeptoren.

Im Gegensatz zu den bisher eingesetzten Substanzen wirkt Lithium nicht auf einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, sondern hat seinen Angriffspunkt direkt in der Zelle (Übersicht bei Manji et al., 1995). Aufgrund von Versuchen zur ADP-Ribosylierung mittels Pertussistoxin wurde gezeigt, daß Lithium die inaktive Konformation von G_i stabilisiert (Masana et al., 1992). Außerdem führt chronische Inkubation mit Lithium zu einer Verminderung der Kopplung zwischen Rezeptor und G-Protein. Da G_i durch Lithium inaktiviert wird, ist die basale Adenylylcyclaseaktivität gesteigert und die cAMP-Spiegel in der Zelle sind erhöht (Hsiao et al., 1992). Einen Anstieg des cAMP-Spiegels bewirken auch GIP und GLP-1. Die in dieser Arbeit an INS-1 Zellen durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß Lithium wie die Inkretinhormone die Menge an α_{i2} -mRNA erhöht. Die α_s -mRNA wird durch Inkubation mit Lithium nicht beeinflusst.

Viele in der Literatur beschriebene Untersuchungen zu Lithium wurden an Hirngewebe oder davon abgeleiteten Zelllinien durchgeführt. Im Cortex der Ratte nimmt nach chronischer

Behandlung der Tiere mit Lithium (Serumspiegel 1 mmol/l) der Gehalt an α_{i1} - und α_{i2} -mRNA ab (Li et al., 1991), während die Menge an α_o - und α_s -mRNA unverändert bleibt (Colin et al., 1991). In GH₃-Zellen führt die Inkubation mit Lithium (2 mmol/l) über 96 h zu einer Verringerung der Menge an α_{i1} - und α_o -mRNA. Ein Anstieg der mRNA-Spiegel nach Forskolinbehandlung wird durch Lithium verhindert. Anders sind die Effekte von Lithium in PC12-Zellen. Hier bleibt die mRNA der G-Protein- α -Untereinheiten nach Lithiumgabe unverändert und eine Zunahme des mRNA-Gehalts von α_{i1} und α_{i3} nach Forskolinbehandlung wird durch Inkubation mit Lithium noch verstärkt (Ebstein et al., 1994). Ein Anstieg, allerdings auf Proteinebene, nach Inkubation mit Lithium wurde auch von Lesch et al. (1991) gezeigt. Durch die Behandlung von Ratten über drei Wochen erhöht sich der Gehalt an G α_i im Hypothalamus und Hippocampus, während die Menge an G α_s unverändert bleibt. McGowan et al. (1996) beobachteten bei Ratten, die über 14 Tage mit Lithium behandelt wurden, einen Anstieg des Gehalts an α_s -, α_o - und α_{i2} -mRNA in verschiedenen Hirnregionen. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Befunde bieten Risby et al. (1991). Sie untersuchten den Einfluß von Lithium auf die Adenylylcyclaseaktivität in verschiedenen Zellsystemen und stellten fest, daß die Wirkung von Lithium auf die Adenylylcyclase spezifisch für unterschiedliche Gewebe und Hirnregionen ist und man in einigen eine Hemmung, in anderen eine Stimulierung der basalen Adenylylcyclaseaktivität findet. Unter der Annahme, daß die cAMP-Spiegel die Regulation der G-Protein-mRNA beeinflussen, kann dieses Ergebnis die oben beschriebenen unterschiedlichen Effekte von Lithium auf den mRNA-Gehalt erklären.

Da Lithium nicht einen extrazellulären Rezeptor aktiviert, macht sein Einfluß auf den Gehalt an α_{i2} -mRNA deutlich, daß die Wirkung auf die G-Protein-mRNA unabhängig von einem Angriffspunkt an G-Protein gekoppelten Rezeptoren erfolgt. Daher kann man annehmen, daß die Regulation der mRNA über eine Beeinflussung des *second messenger* Systems der Zelle vermittelt wird.

5.2.4 cAMP und die Regulation der α_{i2} -mRNA

cAMP vermittelt als *second messenger* nicht nur die schnelle Reaktion der Zelle auf eine hormonelle Stimulation, sondern ist auch an anhaltenden Veränderungen der Transkriptionsrate im Rahmen der Genregulation beteiligt (Kap. 1.3). Erste Hinweise, daß cAMP auch an der Regulation der G-Protein-Genexpression beteiligt ist, erbrachten die Untersuchungen von Hadcock et al. (1990). Die Stimulation von S49 Lymphomazellen mit

Isoprenalin oder Forskolin führt zu einem Anstieg der α_{i2} -mRNA Spiegel. Der gleiche Versuch wurde auch mit der kin^- -Variante der S49 Lymphomazellen durchgeführt. Diesen Zellen fehlt die Proteinkinase A-Aktivität (Hochman et al., 1975). Die Inkubation mit Forskolin oder Isoprenalin hat in kin^- S49 Lymphomazellen keine Erhöhung des Gehalts an α_{i2} -mRNA mehr zur Folge. Eine Aktivierung der Proteinkinase A scheint also für die Regulation der α_{i2} -mRNA notwendig zu sein. Weinstein et al. (1988) klonierten und charakterisierten das Gen für die α_{i2} -Untereinheit. Die Kontrollregion ist sehr GC-reich, enthält mehrere GC-Boxen, die Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor SP1 darstellen, eine CCAAT-Box und eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-2 (Kap. 1.3.1). Diese AP-2 Domäne wurde als möglicher Mediator der cAMP-abhängigen Genregulation diskutiert.

Kinane et al. (1993) untersuchten den Einfluß von Forskolin, einem Aktivator der Adenylylcyclase, auf die α_{i2} -mRNA in LLC-PK₁ Zellen. Mit Hilfe eines Luziferase-Reportergens (Kap. 1.3) zeigten sie, daß die Inkubation mit Forskolin die Transkriptionsrate des α_{i2} -Gens um das Dreifache steigert. Mittels *in vivo footprinting* und *mobility shift assay* (Kap. 1.3) untersuchten sie den Bereich, der für die Forskolin-induzierte Genaktivität verantwortlich ist. Durch Mutationen dieses DNA-Segments identifizierten sie schließlich ein CCAAT-Box Motiv, das die cAMP-abhängige Genregulation vermittelt. Welcher Transkriptionsfaktor an diese DNA-Sequenz bindet und wie er durch veränderte cAMP-Spiegel in seiner Aktivität moduliert wird, ist noch nicht bekannt.

Ein Zusammenhang zwischen α_{i2} -Genregulation und cAMP-Spiegeln wird auch in dieser Arbeit deutlich. Substanzen wie GIP, GLP-1 und Lithium, die die Adenylylcyclase stimulieren, erhöhen den Gehalt an α_{i2} -mRNA, während Galanin, Adrenalin und UK 14.304, die die Adenylylcyclase hemmen, den α_{i2} -mRNA Spiegel senken.

Da die Transkriptionsrate des α_{i2} -Gens nicht durch ein CRE mit dem typischen Palindrom TGACGTCA kontrolliert wird, erfolgt die Regulation anders als bei Genen, die ein klassisches CRE in ihrer Kontrollregion enthalten. Der zeitliche Verlauf unterscheidet sich deutlich. Die Induktion der Transkription durch ein CRE verläuft schnell, erreicht die maximale Rate nach 30 min und nimmt dann langsam wieder ab (Montminy et al., 1990). Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist aber in INS-1 Zellen nach vierstündiger Inkubation noch keine Veränderung des Gehalts an α_{i2} -mRNA erkennbar. Erst nach 8 h sind die α_{i2} -mRNA Spiegel signifikant erhöht oder erniedrigt. Einen ähnlichen, also deutlich langsameren zeitlichen

Verlauf der α_{i2} -mRNA Regulation konnten auch andere Autoren nachweisen (Hadcock et al., 1990; Eschenhagen et al., 1992). Dieser späte Anstieg der Transkriptionsrate läßt annehmen, daß der Regulation des α_{i2} -Gens ein anderer Mechanismus zugrunde liegt. Der Verlauf einer cAMP-abhängigen Steigerung der Transkriptionsrate über ein CRE ist bekannt (Kap. 1.3.1). Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle führt zur Aktivierung der Proteinkinase A. Deren katalytische Untereinheit diffundiert daraufhin in den Zellkern und phosphoryliert ein CRE-bindendes Protein. Durch die Phosphorylierung wird dieser Transkriptionsfaktor aktiviert und leitet die Steigerung der Transkriptionsrate ein. Da für die Stimulation der Gentranskription keine Neusynthese von Proteinen, sondern nur eine Phosphorylierung nötig ist, kann die Transkriptionsrate sehr schnell beeinflußt werden. Kinane et al. (1993) zeigten, daß Cycloheximid, ein Proteinsynthesehemmstoff, die Aktivierung der CCAAT-Box im α_{i2} -Gen und damit die Steigerung der Transkriptionsrate verhindert. Die α_{i2} -Genregulation über erhöhte cAMP-Spiegel scheint demnach abhängig von neu synthetisierten Proteinen zu sein, was den langsamen zeitlichen Verlauf erklären könnte.

5.2.5 Mechanismus der α_S -mRNA Regulation

Der Mechanismus der α_S -Genregulation ist weniger gut untersucht. Kozasa et al. (1988) isolierten und charakterisierten das humane α_S -Gen. Die Promotorregion ist GC-reich. Sie enthält vier GC-Boxen, aber keine typische TATA- oder CCAAT-Box. Damit ist die Region ähnlich aufgebaut, wie bei sogenannten *housekeeping genes*. Diese Gene werden in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und ihre Transkriptionsrate nur in geringem Umfang variiert. Auch G_S kommt in sehr vielen Zelllinien und Geweben vor. Verschiedene Autoren, die eine Regulation der α_{i2} -mRNA nachwiesen, konnten keine Veränderung des Gehalts an α_S -mRNA feststellen (McKenzie und Milligan, 1990; Loganzo und Fletcher, 1992; Bahouth, 1995). Eingesetzt wurden bei diesen Versuchen Follikel stimulierendes Hormon (FSH), Trijodthyronin und Prostaglandin E_1 , also Substanzen, die die Adenylylcyclase beeinflussen. McKenzie und Milligan (1990) setzten auch Forskolin ein und kamen zu der Schlußfolgerung, daß die α_S -mRNA nicht cAMP-abhängig transkribiert wird.

Eine Regulation der α_S -mRNA kann hingegen nach Inkubation mit Corticosteron gezeigt werden (Saito et al., 1989). Nach viertägiger Gabe von Corticosteron steigt im Cortex von Ratten der Gehalt an α_S -mRNA, während der α_{i2} -mRNA Spiegel sinkt. Die Behandlung von Kaninchen mit Dexamethason führt zu einem Anstieg der α_S -mRNA in der Leber (Jiang und Arinze, 1994). An Ratten, bei denen eine Ovariectomie vorgenommen wurde, sinken die

α_S -mRNA Spiegel ab. Substituiert man diese Ratten mit Estradiol, steigt der Gehalt an α_S -mRNA wieder auf das Kontrollniveau an (DePergola et al., 1994). Diese Versuche deuten darauf hin, daß die α_S -mRNA durch Corticosteroide reguliert wird.

Es gibt aber auch Untersuchungen, in denen Änderungen der α_S -mRNA nach Stimulation mit Isoprenalin, Forskolin und dem stabilen cAMP-Analogon 8-Bromo-cAMP beobachtet wurden (Hadcock et al., 1990; Dib et al., 1994). Auch in Bezug auf INS-1 Zellen zeigt sich eine Regulation der α_S -mRNA nach Inkubation mit Adrenalin, UK 14.304, Galanin, GIP oder GLP-1. Ob diese Effekte wie bei der α_{i2} -mRNA auf einer cAMP-abhängigen Beeinflussung der Transkriptionsrate beruhen, ist unklar. Dib et al. (1994) konnten an Astrogliazellen zeigen, daß ein Anstieg des α_S -mRNA Spiegels nicht durch eine Verlängerung der Halbwertszeit dieser mRNA hervorgerufen wird. Daraus schließen sie, daß die Regulation auf der Ebene der Transkriptionsrate stattfindet. Die Abwesenheit einer cAMP-abhängigen Kontrollsequenz im α_S -Gen spricht aber dagegen. Möglich ist, daß die α_S -mRNA zellspezifisch reguliert wird, weil nur in einigen Zellen der für die Regulation nötige Transkriptionsfaktor exprimiert wird. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß über eine Erhöhung der cAMP-Spiegel und die daraus resultierende Aktivierung der Proteinkinase A weiter Proteine beeinflußt werden, die schließlich je nach Zellsystem zu einer Regulation der α_S -mRNA führen können. Damit wäre der Effekt auf die α_S -mRNA nur indirekt über cAMP vermittelt.

5.2.6 Ca^{2+} -abhängige Regulation der mRNA

Die Transkriptionsrate von Genen, deren Kontrollregion ein CRE enthält, steigt bei einer Erhöhung der cAMP-Spiegel in der Zelle an (Kap. 1.3.1). Zusätzlich zum *second messenger* cAMP kann auch ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Genregulation über das CRE beeinflussen. Thompson et al. (1995) zeigten an PC12-Zellen, daß eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration eine Ca^{2+} -abhängige Kinase aktiviert, die nachfolgend das CRE-binding protein phosphoryliert und auf diese Weise die Transkriptionsrate erhöht. Ca^{2+} und cAMP aktivieren verschiedene Proteinkinasen, die aber beide CREB phosphorylieren (Barthel et al., 1996). An HIT-T15 Zellen führen Substanzen wie Bombesin und Acetylcholin, die die Insulinsekretion steigern, zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Mittels eines Reportergens unter der Kontrolle eines CRE zeigten Eckert et al. (1996), daß Bombesin und Acetylcholin Ca^{2+} -abhängig die Transkriptionsrate steigern.

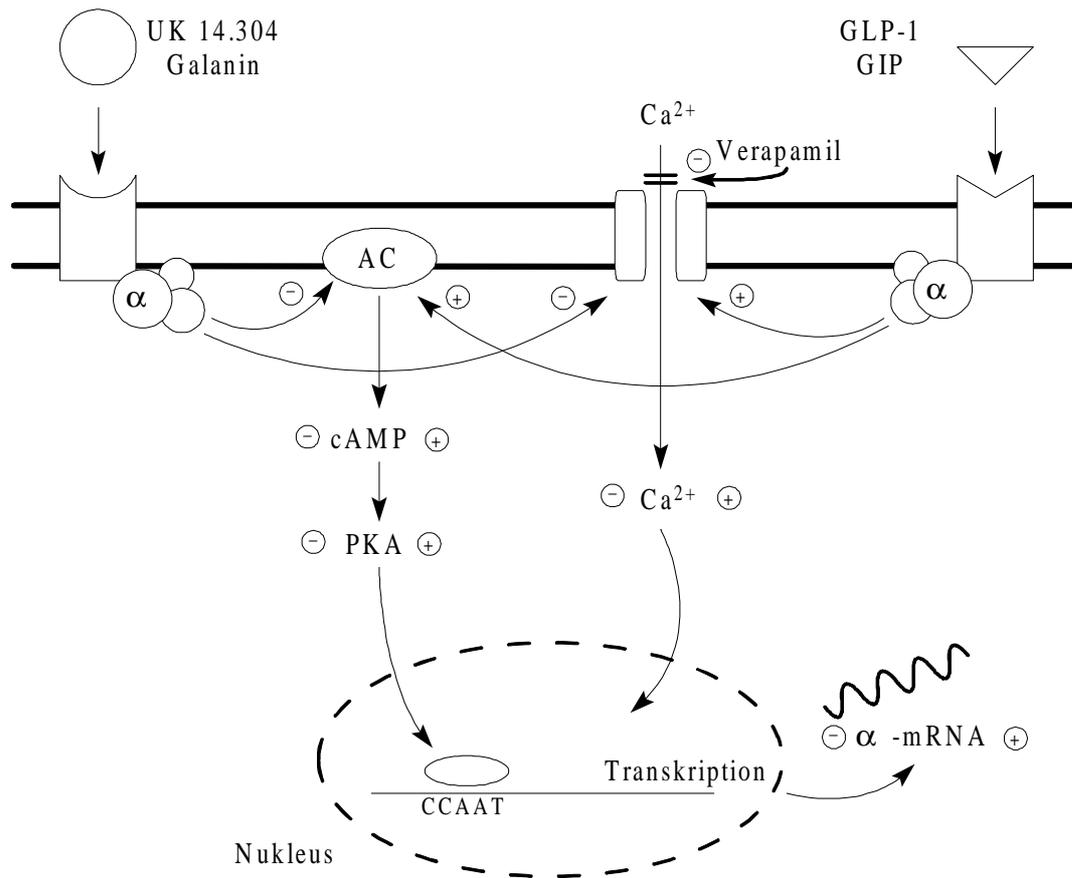


Abb. 5.1 Modell zum Mechanismus der Regulation des α_2 -mRNA Gehalts

Galanin und UK 14.304 vermindern den α_2 -mRNA Spiegel durch die Hemmung des Signaltransduktionssystems: -. GIP und GLP-1 erhöhen den α_2 -mRNA Spiegel durch Stimulation des Signaltransduktionssystems: +.

Die cAMP-abhängige Kontrollregion des α_2 -Gens entspricht nicht dem klassischen CRE. Im α_s -Gen ist noch keine *enhancer*-Sequenz identifiziert worden, die eine *second messenger* induzierte Steigerung der Transkriptionsrate vermittelt. Deshalb sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Regulation der α_s - und α_2 -mRNA durch Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen beeinflusst wird. Dazu wurden INS-1 Zellen über 8 h mit GIP, GLP-1 oder UK 14.304 alleine oder in Kombination mit dem Ca^{2+} -Kanallocker Verapamil inkubiert. Verapamil hat keinen Effekt auf die α_s -mRNA und beeinflusst auch nicht deren durch GIP, GLP-1 oder UK 14.304 hervorgerufene Regulation. Die Inkubation mit Verapamil bewirkt aber eine Abnahme des Gehalts an α_2 -mRNA. Außerdem wird der Anstieg der α_2 -mRNA Spiegel nach Behandlung mit GIP oder GLP-1 durch Verapamil verhindert. Statt einer Erhöhung ruft die Kombination von Verapamil und GIP oder GLP-1 eine Erniedrigung des Gehalts an α_2 -mRNA hervor. Verapamil verhindert den Einstrom von Ca^{2+} und damit

erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel. Aus den Versuchen wird deutlich, daß der Anstieg des Gehalts an α_{i2} -mRNA, nicht aber die Regulation der α_s -mRNA, abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle ist. Ob dieser Einfluß auch, wie für cAMP gezeigt, über die CCAAT-Box vermittelt wird, oder dieser Regulation ein anderer Mechanismus zugrunde liegt, wurde nicht untersucht.

An der Regulation des Gehalts an α_{i2} -mRNA sind also die zwei *second messenger* cAMP und Ca^{2+} beteiligt. Abb. 5.1 zeigt ein Modell, wie UK 14.304 und Galanin auf der einen Seite den α_{i2} -mRNA Spiegel erniedrigen können, während GIP und GLP-1 zu einem Anstieg an α_{i2} -mRNA führen.

5.3 Modulation der Insulinsekretion

5.3.1 Heterologe Desensitivierung der Insulinsekretion

Langanhaltende Exposition eines biologischen Systems mit einem Agonisten führt häufig zu einer Abnahme des biologischen Effekts. Eine derartige Adaptation der zellulären Antwort auf eine chronische Inkubation findet man auch in einer einzelnen Zelle. Eine Regulation kann hier sowohl auf Rezeptorebene, als auch unter Beteiligung anderer Mediatoren der Signaltransduktionswege stattfinden. Man unterscheidet zwischen homologer und heterologer Desensitivierung. Die homologe Desensitivierung betrifft nur den aktivierten Rezeptor, so daß nach seiner wiederholten Stimulation die zelluläre Antwort vermindert ist. Bei der heterologen Desensitivierung ist aufgrund der Beteiligung von Mediatoren des Signaltransduktionssystems auch der Effekt, der über andere Rezeptoren vermittelt wird, beeinträchtigt. Einen Angriffspunkt für die Ausbildung der heterologen Desensitivierung stellen G-Proteine dar, da verschiedene Rezeptoren oder Effektoren über das selbe G-Protein gekoppelt sein können.

Green et al. (1992) untersuchten die heterologe Desensitivierung an Adipozyten von Ratten. Sie zeigten, daß die chronische Inkubation der Adipozyten mit dem Adenosinrezeptoragonisten N-Phenylisopropyladenosin (PIA) zu einer verminderten Sensitivität der Zellen gegenüber Prostaglandin E_1 führt. Entsprechend bewirkt die Behandlung mit PG E_1 ein schwächeres Ansprechen der Adipozyten auf PIA. Parallel zur beobachteten Desensitivierung sinkt die Menge an $\text{G}\alpha_{i1-3}$; der Gehalt an $\text{G}\alpha_s$ bleibt dagegen unverändert. Die Abnahme der inhibitorischen G-Proteine scheint also die Ursache der

heterologen Desensitivierung zu sein. Weiterführende Versuche wurden auch mit dem α_2 -Agonisten UK 14.304 durchgeführt (Gasic und Green, 1995). Auch UK 14.304 ruft eine Abnahme der Menge an $G\alpha_{i1-3}$ hervor und bewirkt dadurch eine Verschiebung der Dosis/Wirkungskurve von PIA nach rechts. Die Adipozyten sind gegenüber PIA desensitiviert. Eschenhagen et al. (1992 b) zeigten, daß in Ratten, die länger mit Isoprenalin behandelt wurden, die Menge an α_{i2} -mRNA zunimmt. Diese Änderung wird von einer verstärkten Ansprechbarkeit auf den mACh-Agonisten Carbachol begleitet. Behandelt man die Ratten über vier Tage mit Carbachol, so nimmt der Gehalt an G_i ab (Eschenhagen et al., 1996). Daraus resultiert ein erhöhter Effekt nach Gabe von Isoprenalin.

Die Beteiligung von G-Proteinen an der Insulinsekretion wurde erstmals von Katada und Ui (1979) gezeigt. Sie behandelten Langerhanssche Inseln der Ratte mit Pertussistoxin, das wegen seines zuerst beobachteten Effekts auch als *islet-activating protein* bezeichnet wird. Die mit Pertussistoxin inkubierten Inseln zeigen eine Steigerung der Glucose-induzierten Insulinsekretion und der cAMP-Spiegel. Die Hemmung der Insulinsekretion nach Vorbehandlung mit Adrenalin ist vermindert (Katada und Ui, 1981; Katada et al., 1982).

An INS-1 Zellen sollte untersucht werden, ob es parallel zur Regulation der α_s - und α_{i2} -mRNA zu einer heterologen Desensitivierung der Insulinsekretion kommt. Die Inkretinhormone GIP und GLP-1 bewirken eine Zunahme des Gehalts an α_s - und α_{i2} -mRNA. Eine Vorinkubation der INS-1 Zellen mit GIP vermindert die durch GLP-1 oder Lithium erhöhte Insulinsekretion im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen. Die Inkubation mit GLP-1 führt ebenfalls zu einer abgeschwächten Wirkung auf die Insulinsekretion nach Stimulation mit GIP, UK 14.304 oder Galanin. Sowohl GIP, als auch GLP-1 verringern nach achtstündiger Vorinkubation die Glucose-induzierte Insulinsekretion. UK 14.304 und Galanin dagegen senken den Gehalt an α_s - und α_{i2} -mRNA. In den Sekretionsversuchen zeigen sie dazu passend die genau gegenteiligen Effekte im Vergleich zu GIP und GLP-1. Die Vorinkubation mit UK 14.304 bewirkt, daß die Insulinsekretion nach Stimulation mit GLP-1 oder Galanin verstärkt ist. Auch die Behandlung der Zellen mit Galanin erhöht die durch GIP oder Lithium hervorgerufene Insulinsekretion. Durch Vorinkubation mit UK 14.304 oder Galanin wird auch die Glucose-induzierte Insulinsekretion gesteigert.

Vergleicht man die an INS-1 Zellen durchgeführten Versuche mit den oben zitierten Beobachtungen, so kann man annehmen, daß ihnen der gleiche Mechanismus zugrunde liegt. Einer Steigerung der α_{i2} -mRNA folgt eine entsprechende Zunahme des G_{i2} -Gehalts. Da somit

die Menge dieses inhibitorischen G-Proteins erhöht ist, resultiert eine verstärkte Hemmung der Insulinsekretion. Nimmt dagegen die Menge an α_{i2} -mRNA ab, liegt weniger inhibitorisches G-Protein vor, und die Insulinsekretion ist gesteigert. Die Änderungen im Gehalt der α_s -mRNA scheinen keine Rolle zu spielen. Eine mögliche Erklärung dafür können Unterschiede zwischen mRNA-Menge und Proteingehalt sein. Hadcock et al. (1990) fanden trotz gesteigener α_s -mRNA Spiegel eine Abnahme an G_s , da gleichzeitig die Halbwertszeit von G_s verkürzt war. Außerdem ist auch die Effektivität der Translation bei verschiedenen G-Protein- α -Untereinheiten unterschiedlich: Li et al. (1996) untersuchten in Gehirn und Herz von Ratten und in GH₃-Zellen das Verhältnis zwischen mRNA- und Proteinmenge. Dabei stellte sich heraus, daß in allen drei Fällen die 10-20fache Menge an α_s -mRNA nötig ist, um eine bestimmte Menge an G_s zu erhalten im Vergleich zu α_o -mRNA bzw. G_o . Besonders ausgeprägt ist dieser Unterschied in GH₃-Zellen. Diese enthalten 94mal mehr α_s -mRNA als α_o -mRNA, während aber die Proteinsyntheserate von G_s nur 9mal größer ist als die von G_o . Im Falle von G_s haben also Änderungen im Gehalt an α_s -mRNA wenig Einfluß auf die Proteinmenge an G_s . Bei G_{i2} zeigt sich dagegen eine Korrelation von α_{i2} -mRNA- und G_{i2} -Proteinmenge (Hadcock et al., 1990; Levine et al., 1990; Eschenhagen et al., 1992; Liao und Clark, 1995; Bahouth, 1995). Da der Einfluß auf die Insulinsekretion dies nahelegt, ist anzunehmen, daß sich auch in INS-1 Zellen die Menge an G_{i2} entsprechend dem Gehalt an α_{i2} -mRNA verändert.

Der genaue Mechanismus, über den eine Änderung der G_{i2} -Menge die heterologe Desensitivierung bewirkt, ist unklar. Reithmann et al. (1990) untersuchten den Einfluß auf die Adenylylcyclase. Danach führt eine Zunahme an G_i zur verstärkten Hemmung der Adenylylcyclase, während die Abnahme an G_i die Aktivität der Adenylylcyclase erhöht (Abb. 5.2).

Weitere Versuche wurden an transgenen Mäusen durchgeführt, bei denen G_{i2} durch Einschleusen von *antisense* RNA ausgeschaltet wurde (Moxham et al., 1993). Diese Mäuse weisen erhöhte basale cAMP-Spiegel auf und die Hemmung der Adenylylcyclase über den Adenosin A₁-Rezeptor ist beeinträchtigt. Einen Zusammenhang zwischen G-Proteinen und Adenylylcyclaseaktivität scheint es auch bei der Ausbildung von Bluthochdruck zu geben (Anand-Srivastava, 1996). Spontan hypertensive Ratten haben erhöhte Mengen an G_{i2} und α_{i2} -mRNA im Herzen und in der Aorta. Die stimulatorischen Effekte von Isoprenalin, Glucagon, Dopamin, Adrenalin und Forskolin auf die Adenylylcyclase sind in diesen

Gewebe vermindert. Angiotensin II und der atriale natriuretische Faktor dagegen hemmen die Adenylylcyclase noch ausgeprägter.

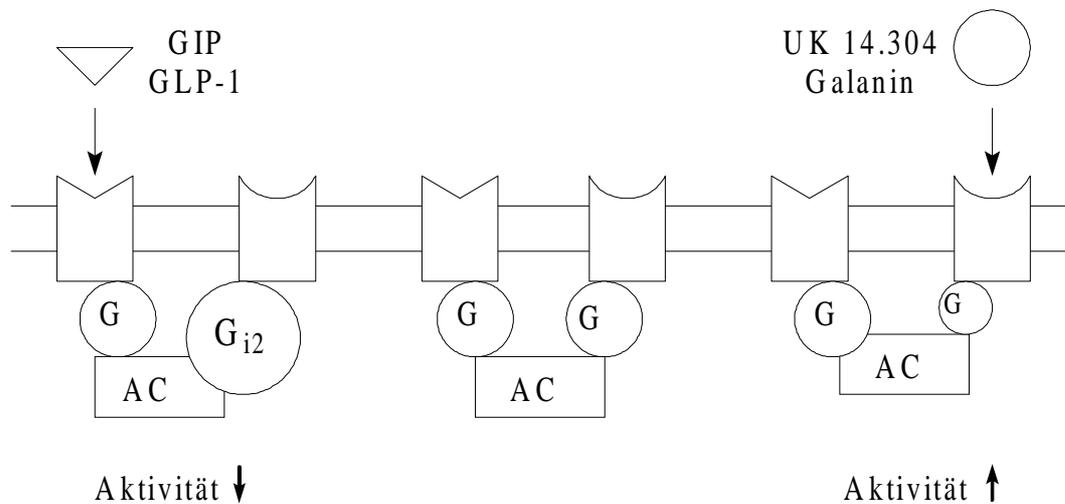


Abb. 5.2 Regulation der Adenylylcyclaseaktivität durch Änderung der Menge an G_i

Chronische Inkubation mit Agonisten, die über G_s die Adenylylcyclase stimulieren, führt zu einem Anstieg an G_i , wodurch die Adenylylcyclaseaktivität gehemmt wird. Chronische Inkubation mit Agonisten, die über G_{i2} die Adenylylcyclase hemmen, bewirkt eine Abnahme an G_{i2} mit nachfolgender stärkerer Aktivierbarkeit der Adenylylcyclase (modifiziert nach Reithmann et al., 1990).

Auch die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auf die Agonist-induzierte Insulinsekretion können durch eine Beeinflussung der Adenylylcyclaseaktivität erklärt werden. GIP und GLP-1 steigern die Insulinsekretion unter anderem durch Aktivierung der Adenylylcyclase (Kap. 1.2.3). Ist die Aktivität der Adenylylcyclase durch eine Abnahme an G_{i2} nach Inkubation mit UK 14.304 oder Galanin gesteigert, kann darüber auch die verstärkte Insulinsekretion bei Stimulation mit GIP oder GLP-1 erklärt werden. Ist dagegen durch Vorinkubation mit GIP oder GLP-1 die Menge an G_{i2} herauf reguliert, nimmt die Aktivierbarkeit der Adenylylcyclase ab. Die akute Steigerung der Insulinsekretion mittels GIP oder GLP-1 ist weniger stark ausgeprägt. Galanin und UK 14.304 hemmen durch Angriff an G_{i2} -gekoppelten Rezeptoren die Adenylylcyclase (Kap. 1.2.4). Dies ist einer der Angriffspunkte, über den sie die Hemmung der Insulinsekretion vermitteln. Ist die Menge an G_{i2} durch Behandlung der INS-1 Zellen heraufreguliert, ist also auch die Hemmung der Insulinsekretion stärker ausgeprägt. Im entgegengesetzten Fall, also bei erniedrigten G_{i2} -Spiegeln, wird die Insulinsekretion weniger stark gehemmt.

Eine Sonderstellung bei der Beeinflussung der Insulinsekretion nimmt Lithium ein. Lithium selbst hat an INS-1 Zellen keinen Effekt auf die Insulinfreisetzung und eine Vorinkubation mit Lithium verändert auch nicht die Glucose-induzierte Insulinsekretion. Die Vorbehandlung der INS-1 Zellen mit Lithium bewirkt jedoch eine Abschwächung der stimulatorischen Wirkung von GIP. Dies kann auf der einen Seite durch die Zunahme der α_{i2} -mRNA erklärt werden. Außerdem ist auch ein direkter Eingriff durch Lithium möglich, indem es die Kopplung zwischen Rezeptor und G-Protein vermindert (Manji et al., 1995). Ein anderes Bild zeigt sich beim Einfluß von Lithium auf die durch UK 14.304 hervorgerufene Hemmung der Insulinsekretion. Hier führt Lithium nicht, wie man aufgrund der Zunahme der α_{i2} -mRNA erwartet, zu einer verstärkten Hemmung, sondern es schwächt die Hemmung der Insulinsekretion sogar ab. Die Glucose-induzierte Insulinsekretion bleibt durch Lithiumvorinkubation unbeeinflusst. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß Lithium durch einen zusätzlichen Mechanismus anders als die oben beschriebenen Agonisten an G-Protein gekoppelten Rezeptoren verhindert, daß die Regulation der α_{i2} -mRNA von einer entsprechenden Veränderung der Proteinmenge begleitet wird. In Frage kommt dafür z. B. ein schneller Abbau von G_{i2} . Lithium hat aber wiederum auch eine direkte Eingriffsmöglichkeit, indem es G_{i2} in seiner inaktiven Konformation stabilisiert (Masana et al., 1992). Somit kann auch eine Zunahme der Menge an G_{i2} keine verstärkte Hemmung der Insulinsekretion durch UK 14.304 zur Folge haben.

5.3.2 Einfluß auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion

Die Vorinkubation mit GIP, GLP-1, UK 14.304 oder Galanin hat neben den Effekten auf die Agonist-induzierte Freisetzung von Insulin auch Einfluß auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion. Glucose stimuliert die Insulinsekretion nicht über einen Angriff an Rezeptoren, sondern indem sie in die Zelle aufgenommen wird und dort metabolisiert wird (Kap. 1.2.1). Dadurch verändert sich das intrazelluläre Verhältnis zwischen ATP und ADP, der ATP-abhängige K^+ -Kanal wird geschlossen und es kommt zur Depolarisation der Zellmembran. Als Folge öffnen sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, und der Einstrom von Ca^{2+} vermittelt über noch unbekannte Mechanismen die Exozytose der Insulingranula. Die Glucose-induzierte Insulinsekretion kann durch stimulatorische oder inhibitorische Hormone moduliert werden. Um die Wechselwirkung zwischen dem durch Glucose aktivierten ATP-abhängigen Regulationssystem und dem hormonal gesteuerten cAMP-abhängigen Signaltransduktionssystem zu beschreiben, wurde das Glucose-Kompetenz-Konzept

entwickelt. Pipeleers et al. (1985) beobachteten, daß isolierte β -Zellen schlechter auf Glucose ansprechen und daß dies mit niedrigen intrazellulären cAMP-Spiegeln korreliert. Henquin und Meissner vermuteten schon 1984, daß cAMP die Aktivität von Ca^{2+} -Kanälen modulieren und darüber den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle erleichtern kann. Eine Steigerung der Insulinsekretion durch erhöhte cAMP-Spiegel erfolgt aber nur bei gleichzeitig gesteigerter Glucosekonzentration (Übersicht bei Malaisse et al., 1984). Holz und Habener (1992) zeigten, daß GLP-1 β -Zellen in einen Glucose-kompetenten Zustand versetzt, indem es den cAMP-Gehalt steigert, so daß dann bei gleichzeitiger Erhöhung der Glucosekonzentration die Insulinsekretion verstärkt ist. Es sind verschiedene Hypothesen aufgestellt worden, über welchen Mechanismus cAMP seine Wirkung hervorruft. Die Erhöhung des cAMP-Spiegels aktiviert die Proteinkinase A. Holz und Habener (1992) untersuchten mittels *patch-clamp* Technik die Aktivität des ATP-abhängigen K^+ -Kanals. In isolierten β -Zellen bleibt der Kanal durch Glucose noch unbeeinflusst, während er bei der gleichen Glucosekonzentration in intakten Inseln schon geschlossen ist. Durch kombinierte Gabe von GLP-1 und Glucose läßt sich der K^+ -Kanal auch in isolierten β -Zellen blockieren. Die Autoren folgern daraus, daß sowohl die Glucose-induzierte Zunahme des ATP-Gehalts, als auch hohe cAMP-Spiegel zur Phosphorylierung des ATP-abhängigen K^+ -Kanals führen können. Die Aktivierung beider Systeme ist nötig, um den Kanal zu inhibieren (Abb. 5.3).

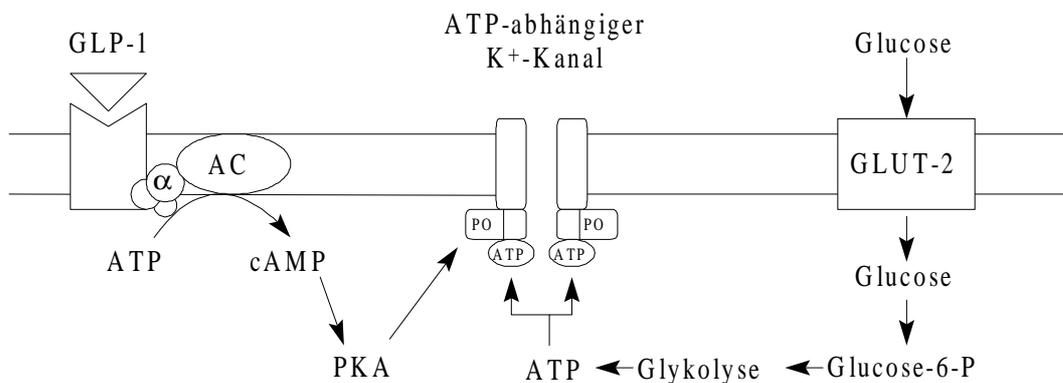


Abb. 5.3 Modell für die durch GLP-1 hervorgerufene Induktion der Glucose-Kompetenz

Die synergistische Interaktion von ATP und cAMP führt zur Phosphorylierung des ATP-abhängigen K^+ -Kanals (nach Holz und Habener, 1992).

Daneben gibt es auch Untersuchungen, die weitere Angriffspunkte der Proteinkinase A nahelegen. So kann die Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle durch Phosphorylierung gesteigert

werden (Ashcroft et al., 1994). Zusätzlich kann cAMP auch die Exozytose selbst unabhängig von der Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration beeinflussen (de Weille et al., 1989).

Die Inaktivierung inhibitorischer G-Proteine durch Pertussis toxin führt zu erhöhten cAMP-Spiegeln in Langerhansschen Inseln der Ratte und zur Steigerung der Glucose-induzierten Insulinsekretion (Katada und Ui, 1979). Auch Moxham et al. (1993) beobachteten, daß eine Abnahme an G_{12} in einer Erhöhung der basalen cAMP-Spiegel resultiert. Wie in der vorliegenden Arbeit an INS-1 Zellen gezeigt wird, ruft die Vorinkubation mit UK 14.304 oder Galanin eine Verringerung des Gehalts an α_{i2} -mRNA hervor. Parallel dazu ist die Glucose-induzierte Insulinsekretion erhöht. Es ist also naheliegend, daß die Steigerung der Glucose-induzierten Insulinsekretion auch hier auf der erhöhten Menge an cAMP beruht (Abb. 5.4). Diese wird durch die Abnahme an G_{12} hervorgerufen.

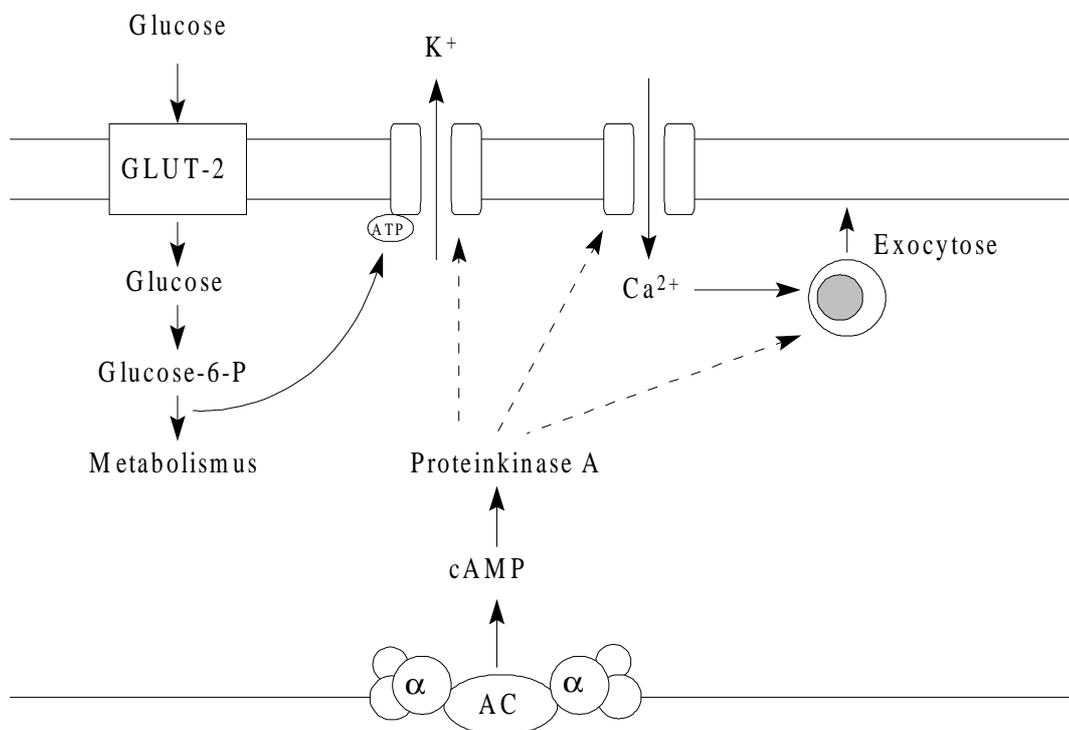


Abb. 5.4 Mögliche Angriffspunkte der cAMP-vermittelten Steigerung der Glucose-induzierten Insulinsekretion

Der cAMP-Spiegel beeinflusst die Aktivität der Proteinkinase A. Diese kann durch Phosphorylierungsreaktionen (gestrichelte Linien) verschiedene Elemente des Glucose-vermittelten Signaltransduktionsweges (durchgezogene Linien) modulieren (modifiziert nach Thorens, 1994).

Der Signaltransduktionsweg über den *second messenger* cAMP ist aber nicht der einzige, der durch die Regulation der Menge an G_{i2} moduliert wird. In zwei verschiedenen Zellkulturen wurde die Expression von G_{i2} durch Einschleusen von *antisense*-mRNA unterdrückt (Watkins et al., 1994). Dadurch weisen diese Zellen erhöhte basale IP_3 -Spiegel auf und die Reaktion auf Hormone, die den Phospholipase C-Signaltransduktionsweg aktivieren, ist verstärkt. Die gleiche Auswirkung zeigt sich auch in Adipozyten von transgenen *knock-out* Mäusen, bei denen G_{i2} nicht exprimiert wird. Im Gegensatz dazu führt die Expression eines mutierten und deshalb ständig aktivierten G_{i2} zur Hemmung der Phospholipase C. Es ist also möglich, daß die in dieser Arbeit gezeigte Desensitivierung der Glucose-induzierten Insulinsekretion auch unter Beteiligung des Phospholipase C-Systems vermittelt wird. Die Aktivierung der Phospholipase C führt zur Bildung der *second messenger* IP_3 und DAG, die über die Freisetzung von Ca^{2+} bzw. über die Aktivierung der Proteinkinase C die Insulinsekretion steigern (Kap. 1.2.2.2). Kommt es nun durch chronische Inkubation mit UK 14.304 oder Galanin zur Abnahme des Gehalts an α_{i2} -mRNA, ist es möglich, daß auch in INS-1 Zellen die basale Aktivität der Phospholipase C erhöht ist. Über diese Erhöhung kann eine Steigerung der Glucose-induzierten Insulinsekretion hervorgerufen werden.

Eine dritte Möglichkeit, wie die Regulation der α_{i2} -mRNA die Glucose-induzierte Insulinsekretion beeinflussen kann, ist die direkte Kontrolle der Exozytose von Insulingranula. G-Proteine spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Übertragung hormoneller Signale ins Zellinnere, sondern sind auch intrazellulär am Transport von Vesikeln beteiligt. Verschiedene G-Proteine regulieren die Degranulation von Mastzellen, die Fusion von Granula in chromaffinen Zellen und auch den Transport von Vesikeln des Golgi-Apparates (Burgoyne, 1992; Übersicht bei Nuoffer und Balch, 1994).

Durch den Nachweis von Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen an den sekretorischen Granula von Langerhansschen Inseln der Ratte und des Menschen und von HIT-T15 Zellen wurde deutlich, daß G-Proteine auch an der direkten Modulation der Exozytose von Insulingranula beteiligt sein können (Kowluru et al., 1994). Konrad et al. (1995) identifizierten ein inhibitorisches G-Protein an Insulingranula der Zelllinie β -TC3 und zeigten, daß die durch Mastoparan hervorgerufene Insulinsekretion auf einer Stimulation der GTPase-Aktivität bzw. einer Aktivierung bestimmter G-Proteine beruht. Schon früher hatten Befunde auf eine Beteiligung von G-Proteinen an der Hemmung der Insulinsekretion hingewiesen. Ullrich und Wollheim (1988) beobachteten, daß in elektropermeabilisierten RINm5F-Zellen die Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren die Ca^{2+} -induzierte Exozytose inhibieren kann. Diese

Hemmung wird durch die Vorbehandlung mit Pertussistoxin verhindert. Die Autoren schließen daraus, daß diese direkte Wirkung über ein G-Protein vermittelt ist. Lang et al. (1995) führten weitere Versuche an HIT-T15 Zellen durch, die mittels Streptolysin O permeabilisiert wurden. Peptide, die G_i aktivieren, blockieren ebenfalls die Insulinsekretion. Am selben Zellsystem zeigt die Expression der mutierten und deshalb ständig aktiven α -Untereinheiten α_{i1-3} oder α_{o2} , daß die α -Untereinheit alleine ausreicht, um die durch Ca^{2+} hervorgerufene Insulinsekretion zu verhindern. $G\alpha_i$ kann also direkt mit Komponenten interagieren, die die Exozytose der Insulingranula bewirken. Der genaue Mechanismus, über den die Insulinsekretion schließlich moduliert wird, ist noch unklar.

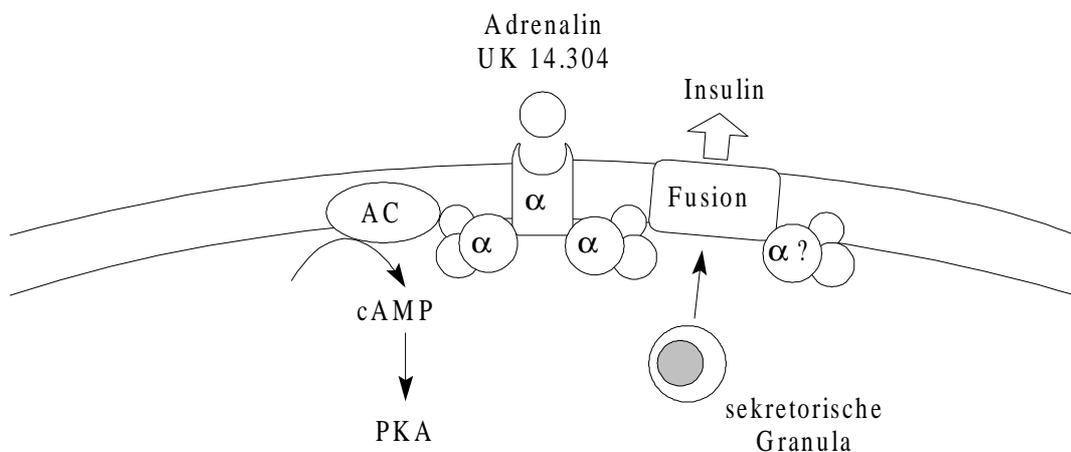


Abb. 5.5 Direkter Einfluß eines „exozytotischen“ G-Proteins auf die Exozytose

Die Aktivierung des Rezeptors kann distal zu bekannten Signaltransduktionswegen ein G_i aktivieren, das die Exozytose hemmt. Auf der anderen Seite kann ein G_e die Exozytose stimulieren (modifiziert nach Ullrich und Wollheim, 1988).

Auch in INS-1 Zellen wurden Pertussistoxin-sensitive G-Proteine an den sekretorischen Granula nachgewiesen (Kowluru et al., 1996). Glucose führt nach ihrer Aufnahme in die β -Zelle zur Bildung verschiedener Mediatoren, u. a. Arachidonsäure, Lysophosphatidylcholin und Phosphatidsäure. Diese Lipide stimulieren die Insulinsekretion (Metz, 1991). Kowluru und Metz (1994) zeigten, daß einer der zugrundeliegenden Mechanismen die Aktivierung von G-Proteinen an den Insulingranula ist. Die Lipide steigern die GTP-Bindung, verlangsamen seine Hydrolyse und stabilisieren so die G-Proteine in ihrer aktiven Konformation. Im Gegensatz dazu beschleunigen Hemmstoffe der Insulinsekretion wie Adrenalin, Clonidin oder PG E₂ die GTP-Hydrolyse (Übersicht bei Kowluru und Metz, 1994b).

Die in dieser Arbeit beobachtete Heraufregulation der Menge an α_{i2} -mRNA in INS-1 Zellen kann nach Stimulation mit Glucose über die Bildung von Arachidonsäure und ähnlichen Metaboliten also dazu führen, daß eine größere Anzahl an inhibitorischem G_{i2} an den Granula aktiviert wird und somit die Insulinsekretion vermindert ist. Eine Abnahme des Gehalts an α_{i2} -mRNA nach Inkubation mit UK 14.304 oder Galanin hat den gegenteiligen Effekt, so daß die Glucose-induzierte Insulinsekretion gesteigert ist.

Welcher dieser drei möglichen Wirkmechanismen - die Beeinflussung des cAMP- oder IP_3 -Systems oder der direkte Angriff bei der Exozytose - der Sensitivierung bzw. Desensitivierung der Glucose-induzierten Insulinsekretion zugrunde liegt oder ob der Effekt auf einem Zusammenspiel der verschiedenen Signaltransduktionswege beruht, kann nicht abschließend beurteilt werden. Die Regulation der α_{i2} -mRNA scheint jedoch als Grundlage der Modulation der Glucose-induzierten Insulinsekretion eine wichtige Rolle zu spielen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

6.1 Ergebnisse

1. Mittels PCR bzw. Northern Blot Technik können die mRNAs von α_s , α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} und α_o in INS-1 Zellen nachgewiesen werden.
2. Adrenalin (50 $\mu\text{mol/l}$), das über α_2 - und β -Adrenozeptoren wirkt, senkt den Gehalt an α_s -mRNA vorübergehend wobei der Effekt nach 4 h am stärksten ausgeprägt ist. Die Menge an α_{i2} -mRNA ist nach 8 h ebenfalls erniedrigt, während nach 24 h eine Zunahme zu beobachten ist.
3. Der β -Adrenozeptoragonist Isoprenalin (10 $\mu\text{mol/l}$) ruft keine Änderung des mRNA-Gehalts von α_s oder α_{i2} hervor.
4. Der α_2 -Adrenozeptoragonist UK 14.304 (1 $\mu\text{mol/l}$) bewirkt eine transiente Verminderung des Gehalts an α_s -mRNA. Die Menge an α_{i2} -mRNA ist anfänglich ebenfalls erniedrigt; nach 24 h ruft UK 14.304 eine Steigerung des Gehalts an α_{i2} -mRNA hervor.
5. Die Inkretinhormone GIP (10 nmol/l) und GLP-1 (10 nmol/l) bewirken eine Zunahme des mRNA-Gehalts von α_s und α_{i2} . Dabei unterscheiden sie sich bezüglich ihres Maximaleffekts und des zeitlichen Verlaufs der Regulation.
6. Galanin (50 nmol/l), ein Hemmstoff der Insulinsekretion, senkt den Gehalt an α_s - und α_{i2} -mRNA.
7. Lithium (10 mmol/l) bewirkt eine ausgeprägte Steigerung des Gehalts an α_{i2} -mRNA, während die Menge an α_s -mRNA unverändert bleibt.
8. Der Ca^{2+} -Kanalblocker Verapamil (50 $\mu\text{mol/l}$) hat keinen Einfluß auf die α_s -mRNA, senkt aber den Gehalt an α_{i2} -mRNA. In Kombination mit GIP oder GLP-1 verhindert Verapamil die Zunahme des mRNA-Gehalts und führt statt dessen zu einer Verminderung des Gehalts an α_{i2} -mRNA.
9. Die Vorinkubation von INS-1 Zellen über 8 h mit GIP (10 nmol/l) oder GLP-1 (10 nmol/l) senkt die Glucose-induzierte oder durch Agonisten modulierte Insulinsekretion.

10. Die Vorinkubation mit Lithium (10 mmol/l) verringert die durch GIP hervorgerufene Steigerung der Insulinsekretion, während die Insulinsekretion nach Gabe von UK 14.304 erhöht ist.
11. Die Vorinkubation mit UK 14.304 (1 μ mol/l) oder Galanin (50 nmol/l) erhöht die Glucose-induzierte oder durch Agonisten modulierte Insulinsekretion.

6.2 Schlußfolgerungen

1. Adrenalin vermittelt seinen Einfluß auf den Gehalt an α_S - und α_{i2} -mRNA über α_2 -Adrenozeptoren.
2. Hormone wie GIP oder GLP-1, die die Insulinsekretion steigern, führen zu einer Zunahme des Gehalts an α_S - und α_{i2} -mRNA, während Substanzen wie UK 14.304 oder Galanin, die die Insulinsekretion hemmen, den Gehalt an α_S - und α_{i2} -mRNA senken.
3. Die Regulation des mRNA-Gehalts ist unabhängig von der Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, denn auch Lithium beeinflusst die Menge an α_{i2} -mRNA.
4. Die von GIP oder GLP-1 hervorgerufene Zunahme des Gehalts an α_{i2} -mRNA ist abhängig von einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle.
5. Hormone, die den Gehalt an α_{i2} -mRNA erhöhen, führen zu einer heterologen Desensitivierung der Insulinsekretion, so daß eine nachfolgende Stimulation der Insulinfreisetzung weniger stark ausgeprägt ist. Die Hemmung der Insulinsekretion über andere Rezeptoren ist verstärkt.
6. Substanzen, die den Gehalt an α_{i2} -mRNA senken, steigern die Glucose-induzierte oder durch Inkretinhormone stimulierte Insulinsekretion. Die Hemmung der Insulinsekretion ist weniger stark ausgeprägt.

⇒ Die Regulation der α_{i2} -mRNA ist also ein wichtiger Mechanismus bei der heterologen Desensitivierung der Insulinsekretion.

7 LITERATUR

Ahrén, B. (1996)

Glucagon-like peptide-1(7-36)amide increases cyclic AMP accumulation in normal islets
Pancreas 12, 211-213

Ahrén, B. (1996a)

Galanin increases cytoplasmic calcium in insulin-producing RINm5F cells by activating phospholipase C
Biochem. Biophys. Res. Commun. 221, 89-94

Ahrén, B., Ar'Rajab, A., Böttcher, G., Sundler, F., Dunning, B. E. (1991)

Presence of galanin in human pancreatic nerves and inhibition of insulin secretion from isolated human islets
Cell Tissue Res. 264, 263-267

Ahrén, B., Taborsky, G. J., Porte, D. (1986)

Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion
Diabetologia 29, 827-836

Akimoto, K., Mizuno, K., Osada, S., Hirai, S., Tanuma, S., Suzuki, K., Ohno, S. (1994)

A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC λ , expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells
J. Biol. Chem. 269, 12.677-12.683

Amiranoff, B., Vauclin-Jacques, N., Laburthe, M. (1984)

Functional GIP receptors in a hamster pancreatic beta cell line In 111: specific binding and biological effects
Biochem. Biophys. Res. Commun. 123, 671-678

Anand-Srivastava, M. B. (1996)

G-proteins and adenylyl cyclase signalling in hypertension
Mol. Cell. Biochem. 157, 163-170

Andersen, D. K., Meneilly, G. S., Sclater, A. (1990)

The insulinotropic effect of GIP: a dose response comparison and comparison to glucagon-like peptide-1(7-37)amide (GLP)
Diabetes 39 Suppl. 1, 142 A

Anderson, J. H., Blackard, W. G. (1978)

Effect of lithium on pancreatic islet insulin release
Endocrinology 102, 291-295

Arkhammar, P., Juntti-Berggren, L., Larsson, O., Welsh, M., Nanberg, E., Sjöholm, A., Köhler, M., Berggren, P. O. (1994)

Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function of the β -cell voltage-activated Ca²⁺ channels
J. Biol. Chem. 269, 2.743-2.749

- Arkhammar, P., Nilsson, T., Welsh, M., Welsh, N., Berggren, P. O. (1989)
Effects of protein kinase C activation on the regulation of the stimulus-secretion coupling in pancreatic β -cells
Biochem. J. 264, 207-215
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., Wollheim, C. B. (1992)
Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differential insulin-secreting cell lines
Endocrinology 130, 167-178
- Ashcroft, F. M., Kelly, R. P., Smith, P. A. (1990)
Two types of Ca^{2+} channels in rat pancreatic β -cells
Pfluegers Arch. 415, 504-506
- Ashcroft, F. M., Proks, P., Smith, P. A., Ämmälä, C., Bokvist, K., Rorsman, P. (1994)
Stimulus-secretion coupling in pancreatic β -cells
J. Cell. Biochem. 55 Suppl., 54-65
- Ashcroft, S. J. H., Hughes, S. J. (1990)
Protein phosphorylation in the regulation of insulin secretion and biosynthesis
Biochem. Soc. Trans. 18, 116-118
- Azzi, A., Boscoboinik, D., Hensey, C. (1992)
The protein kinase C family
Eur. J. Biochem. 208, 547-557
- Bahouth, S. W. (1995)
Thyroid hormone regulation of transmembrane signalling in neonatal rat ventricular myocytes by selective alteration of the expression and coupling of G-protein α -subunits
Biochem. J. 307, 831-841
- Bartfai, T., Hokfelt, T., Langel, U. (1993)
Galanin-a neuroendocrine peptide
Crit. Rev. Neurobiol. 7, 229-274
- Barthel, F., Boutillier, A. L., Trouslard, J., Loeffler, J. P. (1996)
Fine tuning of calcium entry into neurons regulates adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent transcription by several distinct mechanisms
Neuroscience 70, 1.053-1.065
- Beals, C. R., Wilson, C. B., Perlmutter, R. M. (1987)
A small multigene family encodes G_i signal-transduction proteins
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7.886-7.890
- Bedecs, K., Berthold, M., Bartfai, T. (1995)
Galanin-10 years with a neuroendocrine peptide
Int. J. Biochem. Cell. Biol. 27, 337-349
- Bell, G. I., Santerre, R. F., Mullenbach, G. T. (1983)
Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides
Nature 302, 716-718

- Bergsten, P. (1995)
Slow and fast oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} in pancreatic islets correspond to pulsatile insulin release
Am. J. Physiol. 31, E282-E287
- Berrow, N. S., Milligan, G., Morgan, N. G. (1992)
Immunological characterization of the guanine-nucleotide binding proteins G_i and G_o in rat islets of Langerhans
J. Mol. Endocrin. 8, 103-108
- Bersani, M., Johnsen, A. H., Hojrup, P., Dunning, B. E., Andreasen, J. J., Holst, J. J. (1991)
Human galanin : primary structure and identification of two molecular forms
FEBS Lett. 283, 189-194
- Birnbaumer, L., Abramowitz, J., Brown, A. M. (1990)
Receptor-effector coupling by G proteins
Biochim. Biophys. Acta 1031, 163-224
- Birnbaumer, L., Yatani, A., VanDongen, A. M. J., Graf, R., Codina, J., Okabe, K., Mattera, R., Brown, A. M. (1990 a)
G protein coupling of receptors to ionic channels and other effector systems
Br. J. Clin. Pharmacol. 30, 13S-22S
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucleic Acids Research 7, 1513-1522
- Boarder, M. R. (1994)
A role for phospholipase D in control of mitogenesis
Trends Pharmacol. Sci. 15, 57-62
- Bockaert, J., Pin, J., Fagni, L. (1993)
Metabotropic glutamate receptors: an original family of G protein-coupled receptors
Fundam. Clin. Pharmacol. 7, 473-485
- Bode, H. P., Göke, B. (1994)
Protein kinase C activates capacitative calcium entry in the insulin secreting cell line RINm5F
FEBS Lett. 339, 307-311
- Bokoch, G. M., Katada, T., Northup, J. K., Ui, M., Gilman, A. G. (1984)
Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase
J. Biol. Chem. 259, 3.560-3.567
- Bray, P., Carter, A., Guo, V., Puckett, C., Kanholz, J., Spiegel, A. M., Nirenberg, M., (1987)
Human cDNA clones for an α subunit of G_i signal-transduction protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5.115-5.119
- Bronstein, I., Fortin, J., Stanley, P. E., Stewart, G. S. A. B., Kricka, L. J. (1994)
Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays
Analyt. Biochem. 219, 169-181

- Brown, J., Dryburgh, J., Ross, S., Dupre, J. (1975)
Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide
Recent Prog. Horm. Res. 31, 487-532
- Brubaker, P. L. (1991)
Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by intestinal regulatory peptides
Endocrinology 128, 3.175-3.182
- Brunnicardi, F. C., Berlin, E. A., Rademaker, D., Elahi, D., Andersen, D. K. (1986)
Gastric inhibitory polypeptide activation of β -cell calcium transport
Can. J. Physiol. Pharmacol. 64 Suppl., 58-59
- Brunnicardi, F. C., Sun, Y. S., Druck, P., Goulet, R. J., Elahi, D., Andersen, D. K. (1987)
Splanchnic neural regulation of insulin and glucagon secretion in the isolated perfused human pancreas
Am. J. Surg. 153, 34-40
- Buchan, A. M., Ingman-Baker, J. J., Levy, J., Brown, J. C. (1982)
A comparison of the ability of serum and monoclonal antibodies to gastric inhibitory polypeptide to detect immunoreactive cells in the gastroenteropancreatic system of mammals and reptiles
Histochemistry 76, 341-349
- Buchan, A. M., Polak, J. M., Capella, C., Solcia, E., Pearse, A. G. E. (1978)
Electron immunocytochemical evidence for the K cell localization of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in man
Histochemistry 56, 37-44
- Buffa, R., Polak, J. M., Pearse, A. G. E., Solcia, E., Grimelius, L., Capella, C. (1975)
Identification of the intestinal cells storing gastric inhibitory polypeptide
Histochemistry 43, 249-255
- Burgess, T. L., Kelly, R. B. (1987)
Constitutive and regulated secretion of proteins
Annu. Rev. Cell Biol. 3, 243-293
- Burgoyne, R. D. (1992)
Trimeric G proteins in Golgi transport
TIBS 17, 87-88
- Calle, R., Ganesan, S., Smallwood, J. I., Rasmussen, H. (1992)
Glucose-induced phosphorylation of myristoylated alanine-rich C kinase substrates (MARCKS) in isolated rat pancreatic islets
J. Biol. Chem. 267, 18.723-18.727
- Cambridge, D. (1981)
UK 14.304, a potent and selective α_2 -agonist for the characterisation of α -adrenoceptor subtypes
European Journal of Pharmacology 72, 413-415
- Camps, M., Hou, C., Sidiropoulos, D., Stock, J. B., Jakobs, K. H., Gierschik, P. (1992)
Stimulation of phospholipase C by guanine-nucleotide-binding protein $\beta\gamma$ -subunit
Eur. J. Biochem. 206, 821-831

- Cannon, S. D., Wilson, S. P., Walsh, K. B. (1993)
A G protein-activated K⁺ current in bovine adrenal chromaffin cells: possible regulatory role in exocytosis
Mol. Pharmacol. 45, 109-116
- Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1993)
Catecholamine receptors: structure, function, and regulation
Recent Prog. Hormone Res. 48, 277-290
- Caviezel, F., Cattaneo, A. G., Cetta, G., Pozza, G. (1987)
Influence of short-term lithium carbonate administration on stimulated insulin secretion in normal man
Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 25, 188-193
- Chan, S. L. F., Brown, C. A., Scarpello, K. E., Morgan, N. G. (1994)
The imidazoline site involved in control of insulin secretion: characteristics that distinguish it from I₁- and I₂-sites
Br. J. Pharmacol. 112, 1.065-1.070
- Chien, A., Edgar, D. B., Trela, J. M. (1976)
Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *thermus aquaticus*
J. Bacteriol. 127, 1550-1557
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., Rutter, W. J. (1979)
Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases
Biochemistry 18, 5294-5299
- Chomczynski, P. (1992)
Solubilization in formamide protects RNA from degradation
Nucleic Acid Res. 20, 3791-3792
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987)
Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction
Analytical Biochemistry 162, 156-159
- Clapham, D. E., Neer, E. J. (1993)
New roles for G-protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signaling
Nature 365, 403-406
- Clausen, T. (1968)
The relationship between the transport of glucose and cations across cell membranes in isolated tissues: the „insulin-like“ effect of Li⁺
Biochim. Biophys. Acta 150, 66-72
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. (1972)
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 2110-2114
- Colin, S. F., Chang, H. C., Mollner, S., Pfeuffer, T., Reed, R. R., Duman, R. S., Nestler, E. J. (1991)
Chronic lithium regulates the expression of adenylate cyclase and G_i-protein alpha subunit in rat cerebral cortex
Proc. Natl. Sci. USA 88, 10.634-10.637

- Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y., Van Obberghen, E., Spiegel, A. M. Sharp, G. W. G. (1991)
Identification of G protein alpha-subunits in RINm5F cells and their selective interaction with galanin receptor
Diabetes 40, 1.170-1.176
- Creutzfeld, W., Nauck, M. (1992)
Gut hormones and diabetes mellitus
Diabetes/Metab. Rev. 8, 149-177
- Dagert, M., Ehrlich, S.D. (1979)
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells
Gene 6, 23-28
- De Weille, J. R., Schmid-Antomarchi, H., Fosset, M., Lazdunski, M. (1989)
Regulation of ATP-sensitive K⁺-channels in insulinoma cells: activation by somatostatin and protein kinase C and the role of cAMP
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2.971-2.975
- De Weille, J. R., Schmid-Antomarchi, H., Fosset, M., Lazdunski, M. (1988)
ATP-sensitive K⁺ channels that are blocked by hypoglycemia-inducing sulfonylureas in insulin-secreting cells are activated by galanin, a hyperglycemia-inducing hormone
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1.312-1.316
- DeMazancourt, P., Goldsmith, P. K., Weinstein, L. S. (1994)
Inhibition of adenylate cyclase activity by galanin in rat insulinoma cells is mediated by the G-protein Gi3
Biochem. J. 303, 369-375
- DePergola, G., Xu, X., Carlsson, B., Eriksson, P., Edén, S., Giorgino, R., Björntorp, P. (1994)
Estradiol regulation of mRNA expression of stimulatory G-protein α -subunit in white adipose tissue from female rats
Eur. J. Endocrinology 130, 146-150
- DeVivo, M., Iyengar, R. (1994)
G protein pathways: signal processing by effectors
Mol. Cell. Endocrin. 100, 65-70
- Dib, K., El Jamali, A., Jacquemin, C., Correze, C. (1994)
Cyclic AMP regulation of messenger RNA level of the stimulatory GTP-binding protein G_s α
Eur. J. Biochem. 219, 529-537
- Dillon, J. S., Lu, M., Wheeler, M. B., Boyd, A. E. (1994)
 β -cell receptors
Molecular Biology of Diabetes, 285-301, Humana Press Inc., Totawa, NJ
- Dolphin, A. C. (1991)
Regulation of calcium channel activity by GTP binding proteins and second messengers
Biochim. Biophys. Acta 1091, 68-80
- Drucker, D. J., Asa, S. L. (1988)
Glucagon gene expression in vertebrate brain
J. Biol. Chem. 263, 13.475-13.478

- Drucker, D. J., Philippe, L., Mojsov, S., Chick, W. L., Habener, J. F. (1987)
Glucagon-like peptide-1 stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3.434-3.438
- Dunning, B. F., Ahrén, B., Veith, R. C., Böttcher, G., Sundler, F. V., Taborsky, G. J. (1986)
Galanin: a novel pancreatic polypeptide
Am. J. Physiol. 251, E127-E133
- Dupre, J. (1991)
Influence of the gut on the endocrine pancreas: an overview of established and potential physiological mechanisms
The Endocrine Pancreas, 253-281, Raven Press, New York
- Ebert, R., Creutzfeld, W. (1982)
Influence of gastric inhibitory polypeptide antiserum on glucose-induced insulin secretion in rats
Endocrinology 111, 1.601-1.606
- Ebert, R., Creutzfeld, W. (1987)
Gastrointestinal peptides and insulin secretion
Diab. Met. Rev. 3, 1-16
- Ebstein, R. P., Bennett, E. R., Shoham, S., Sokoloff, M. (1994)
Lithium regulation of G protein mRNA levels in PC12 and GH3 cells: theoretical implications for gene therapy in bipolar illness
Gene Therapy 1 Suppl. 1, S86
- Eckert, B., Schwaninger, M., Knepel, W. (1996)
Calcium-mobilizing insulin secretagogues stimulate transcription that is directed by the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate/calcium response element in a pancreatic islet β -cell line
Endocrinology 137, 225-233
- Eissele, R., Göke, R., Willemer, S., Harthus, H. P., Vermeer, H., Arnold, R., Göke, B. (1992)
Glucagon-like peptide-1(7-36)amide cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man
Eur. J. Clin. Invest. 22, 283-291
- Eschenhagen, T., Mende, U., Diederich, M., Hertle, B., Memmesheimer, C., Pohl, A., Schmitz, W., Scholz, H., Steinfath, M., Bohm, M., Michel, M. C., Brodde, O. E., Raap, A. (1996)
Chronic treatment with carbachol sensitizes the myocardium to cAMP induced arrhythmia
Circulation 93, 763-771
- Eschenhagen, T., Mende, U., Diederich, M., Nose, M., Schmitz, W., Scholz, H., Schulte am Esch, J., Warnholtz, A., Schäfer, H. (1992)
Long term β -adrenoceptor-mediated up-regulation of $G_i\alpha$ and $G_o\alpha$ mRNA levels and pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins in rat heart
Molecular Pharmacology 42, 773-783

- Eschenhagen, T., Mende, U., Nose, M., Schmitz, W., Scholz, H., Schulte am Esch, J., Sempell, R., Warnholtz, A., Wüstel, J.-M. (1992 b)
Regulation and possible functional implications of G-protein mRNA expression in nonfailing and failing ventricular myocardium
Basic Res. Cardiol. 87 Suppl. 1, 51-64
- Eschenhagen, T., Mende, U., Nose, M., Schmitz, W., Scholz, H., Warnholtz, A., Wüstel, J.-M. (1991)
Isoprenaline-induced increase in mRNA levels of inhibitory G-protein α -subunits in rat heart
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 343, 609-615
- Fehmann, H.-C., Göke, R., Göke, B. (1995)
Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin releasing polypeptide
Endocrine Rev. 16, 390-410
- Fehmann, H.-C., Göke, R., Göke, B., Bächle, R., Wagner, B., Arnold, R. (1991)
Priming effect of glucagon-like peptide-1(7-36)amide, glucose-dependent insulinotropic polypeptide and cholecystokinin-8 at the isolated perfused rat pancreas
Biochim. Biophys. Acta 1091, 356-363
- Fehmann, H.-C., Habener, J. F. (1991)
Homologous desensitization of the insulinotropic glucagon-like peptide-1(7-37) receptor on insulinoma (HIT-T15) cells
Endocrinology 128, 2.880-2.888
- Fehmann, H.-C., Habener, J. F. (1992)
Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma β TC-1 cells
Endocrinology 130, 159-166
- Fields, T. A., Linder, M. E., Casey, P. J. (1994)
Subtype-specific binding of azidoanilido-GTP by purified G protein α subunits
Biochemistry 33, 6.877-6.883
- Fisher, K. J., Aronson, N. N. Jr. (1992)
Characterization of the cDNA and genomic sequence of a G protein γ subunit (γ_5)
Mol. Cell. Biol. 12, 1.585-1.597
- Fontanela, T., García Hermida, O., Gómez-Acebo, J. (1986)
Blocking effect of naloxone, dihydroergotamine and adrenalectomy on lithium-induced hyperglycemia and glucose intolerance in the rat
Acta Endocrinol. 111,342-348
- Fontanela, T., García Hermida, O., Gómez-Acebo, J. (1987)
Dihydroergotamine, but not naloxone, counteracts lithium as an inhibitor of glucose-induced insulin release in isolated rat islets in vitro
Diabetologia 30, 183-187

- Fontanela, T., García Hermida, O., Gómez-Acebo, J. (1990)
Role of adrenoceptors in vitro and in vivo in the effects of lithium on blood glucose levels and insulin
Br. J. Pharmacol. 100, 283-288
- Fridolf, T., Ahrén, B. (1993)
Dual action of the neuropeptide galanin on the cytoplasmic free calcium concentration in RINm5F cells
Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 1.224-1.229
- García Hermida, O., Fontanela, T., Ghiglione, M., Uttenthal, L. O. (1991)
Effect of pertussis pretreatment on plasma glucose and insulin responses to lithium in rats
Br. J. Pharmacol. 103, 1.309-1.312
- García Hermida, O., Fontanela, T., Ghiglione, M., Uttenthal, L. O. (1994)
Effect of lithium on plasma glucose, insulin and glucagon in normal and streptozotocin-diabetic rats: role of glucagon in the hyperglycaemic response
Br. J. Pharmacol. 111, 861-865
- Gasic, S., Green, A. (1995)
G_i down-regulation and heterologous desensitization in adipocytes after treatment with the α_2 -agonist UK 14.304
Biochem. Pharmacology 49, 785-790
- Gierschik, P., Camps, M. (1994)
Stimulation of phospholipase C by G-protein $\beta\gamma$ subunits
Methods Enzymol. 238, 181-195
- Gillison, S. L., Sharp, G. W. G. (1994)
ADP ribosylation by cholera toxin identifies three G-proteins that are activated by the galanin receptor. Studies with RINm5F cell membranes
Diabetes 43, 24-32
- Gilman, A. G. (1987)
G proteins: transducers of receptor-generated signals
Annu. Rev. Biochem. 56, 615-649
- Göke, R., Conlon, J. M. (1988)
Receptors for glucagon-like Peptide-1(7-36)amide on rat insulinoma derived cells
J. Endocrinol. 116, 357-362
- Göke, R., Larsen, P. J., Mikkelsen, J. D., Scheikh, S. P. (1995)
Identification of specific binding sites for glucagon-like peptide-1 on the posterior lobe of the rat pituitary
Neuroendocrinology 62, 130-134
- Göke, R., Trautmann, M. E., Haus, E., Richter, G., Fehmann, H.-C., Arnold, R., Göke, B. (1989)
Signal transmission after GLP-1(7-36)amide binding in RINm5F cells
Am. J. Physiol. 257, G397-G401
- Gollasch, M., Kleuss, C., Hescheler, J., Wittig, B., Schultz, G. (1993)
G₁₂ and protein kinase C are required for thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels in rat pituitary GH₃ cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6.265-6.269

- Gonzalez, G. A., Montminy, M. R. (1989)
Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133
Cell 59, 675-680
- Green, A., Milligan, G., Dobias, S. B. (1992)
G_i down-regulation as a mechanism for heterologous desensitization in adipocytes
J. Biol. Chem. 267, 3.223-3.229
- Gromada, J., Dissing, S., Rorsman, P. (1996)
Desensitization of glucagon-like peptide-1 receptors in insulin secretion β TC3 cells: role of PKA independent mechanisms
Br. J. Pharmacol. 118, 769-775
- Gronau, K. A., Brubaker, P. L. (1995)
Mechanism of action of glucagon-like peptide-1(7-36 NH₂) in isolated rat pancreatic islets and abrogation of its effects in long-term incubations
Endocrine 3, 795-799
- Gudermann, T., Nürnberg, B., Schultz, G. (1995)
Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction
J. Mol. Med. 73, 51-63
- Gutniak, M. K., Guenifi, A., Berggren, L. J., Host, J. J., Hellstrom, P. M., Efendic, S. (1996)
Glucagon-like peptide-1 enhances the insulinotropic effect of glibenclamide in NIDDM patients and in the perfused rat pancreas
Diabetes Care 19, 857-863
- Gutniak, M., Ørskov, C., Holst, J. J., Ahrén, B., Efendic, S. (1992)
antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus
N. Engl. J. Med. 326, 1.316-1.322
- Hadcock, J., R., Ross, M., Watkins, D. C., Malbon, C. C. (1990)
Cross-regulation between G-protein-mediated pathways
The Journal of Biological Chemistry 265, 14.784-14.790
- Halban, P. A., Praz, G. A., Wollheim, C. B. (1983)
Abnormal glucose metabolism accompanies failure of glucose to stimulate insulin release from a rat pancreatic cell line (RINm5F)
Biochem. J. 212, 439-443
- Hales, C. N., Randle, P. J. (1963)
Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate
Biochem. J. 88, 137-146
- Hargrave, P. A., Hamm, H. E., Hofmann, K. P. (1993)
Interaction of rhodopsin with the G protein transducin
Bioassays 15, 43-50

- Hausdorff, W. P., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1990)
Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function
FASEB J. 4, 2.881-2.889
- Havel, P. J., Mundinger, T. O., Veith, R. C., Dunning, B. E., Taborsky, G. J. (1992)
Corelease of galanin and NE from pancreatic sympathetic nerves during severe hypoglycemia in dogs
Am. J. Physiol. 263, E8-E16
- Henquin, J. C., Meissner, H. P. (1984)
The ionic, electrical, and secretory effects of endogenous cyclic adenosine monophosphate in mouse pancreatic B cells: studies with forskolin
Endocrinology 115, 1125-
- Hepler, J. R., Gilman, A. G. (1992)
G proteins
TIBS 17, 383-387
- Hepler, J. R., Kozasa, T., Smrcka, A. V., Simon, M. I., Rhee, S. G., Sternweis, P. C., Gilman, A. G. (1993)
Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$. Activation of purified phospholipase C isozymes by $G\alpha$ subunits
J. Biol. Chem. 268, 14.367-14.375
- Herrmannrinke, C., Horsch, D., McGregor, G. P., Göke, B. (1996)
Galanin is a potent inhibitor of glucagon-like peptide-1 secretion from rat ileum
Peptides 17, 571-576
- Hillaire-Buys, D., Gross, R., Roye, M., Ribes, G., Loubatières-Mariani, M.-M. (1992)
Adrenergic inhibition of insulin secretion involves pertussis toxin-sensitive and -insensitive mechanisms
Eur. J. Pharmacol. 218, 359-362
- Hochman, J., Insel, P. A., Bourne, H. R., Coffino, P., Tomkins, G. M. (1975)
A structural gene mutation affecting the regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase in mouse lymphoma cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 5.051-5.055
- Holst, J. J., Ørskov, C., Nielsen, O. V., Schwartz, T. W. (1987)
Truncated glucagon-like peptide 1 an insulin-releasing hormone from the distal gut
FEBS Lett. 211, 169-174
- Holz, G. G., Habener, J. F. (1992)
Signal transduction crosstalk in the endocrine system: pancreatic β -cells and the glucose competence concept
TIBS 17, 388-393
- Holz, G. G., Kuhlreiber, W. M., Habener, J. F. (1993)
Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37)
Nature 361, 362-365

- Holz, G. G., Leech, C. A., Habener, J. F. (1995)
Activation of a cAMP-regulated Ca²⁺-signaling pathway in pancreatic β -cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1
J. Biol. Chem. 270, 17.749-17.757
- Homaidan, F. R., Sharp, G. W. G., Nowak, L. M. (1991)
Galanin inhibits a dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ current in the RINm5F cell line
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 8.744-8.748
- Hsiao, J. K., Manji, H. K., Chen, G. A., Bitran, J. A., Risby, E. D., Potter, W. Z. (1992)
Lithium administration modulates platelet G_i in humans
Life Sci. 50, 227-233
- Hsu, W. H., Xiang, H., Rajan, A. S., Boyd III, A. E. (1991)
Activation of α_2 -adrenergic receptors decreases Ca²⁺ influx to inhibit insulin secretion in a hamster β -cell line: an action mediated by a guanosine triphosphate-binding protein
Endocrinology 128, 958-964
- Hughes, S. J., Christie, M. R., Ashcroft, S. J. H. (1987)
Potentiators of insulin secretion modulate Ca²⁺ sensitivity in rat pancreatic islets
Mol. Cell. Endocrinol. 50, 231-236
- Imagawa, M., Chiu, R., Karin, M. (1987)
Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP
Cell 51, 251-260
- Iyengar, R. (1993)
Molecular and functional diversity of mammalian G_S-stimulated adenylyl cyclases
FASEB J. 7, 768-775
- Jacob, F., Monod, J. (1961)
Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins
L. Mol. Biol. 3, 318-356
- Jahangeer, S., Rodbell, M. (1993)
The disaggregation theory of signal transduction revisited: Further evidence that G proteins are multimeric and disaggregate to monomers when activated
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8.782-8.786
- Jiang, P., Arinze, I. J. (1994)
Developmental and glucocorticoid modulation of the expression of mRNA for G_S α and G β subunits in neonatal liver
Mol. Cell. Endocrin. 99, 95-102
- John, G. W., Doxey, J. C., Walter, D. S., Reid, J. L. (1990)
Selective α_2 -adrenoceptor blockade does not enhance glucose-evoked insulin release
Eur. J. Pharmacol. 187, 531-536

- Johnson, J. H., Newgard, C. B., Milburn, J. L., Lodish, H. F., Thorens, B. (1990)
The high K_m glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary esquence
J. Biol. Chem. 265, 6.548-6.551
- Jolly, Y. C., Major, C., Wolf, B. A. (1993)
Transient activation of calcium-dependent phospholipase A_2 by insulin secretagogues in isolated pancreatic islets
Biochemistry 32, 12.209-12.217
- Jones, D. T., Reed, R. R. (1987)
Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium
J. Biol. Chem. 262, 14.241-14.249
- Jones, G. R., Lazarus, J. H., Davies, C. J., Greenwood, R. H. (1983)
The effect of short term lithium carbonate in type II diabetes mellitus
Horm. Metabol. Res. 15, 422-424
- Jones, P. M., Persaud, S. J. (1993)
Arachidonic acid as a second messenger in glucose-induced insulin secretion from pancreatic β -cells
J. Endocrin. 137, 7-14
- Jones, P. M., Persaud, S. J., Howell, S. L. (1992)
Insulin secretion and protein phosphorylation in PKC-depleted islets of Langerhans
Life Sci. 50, 761-767
- Jones, P. M., Stutchfield, J., Howell, S. L. (1985)
Effects of Ca^{2+} and a phorbol ester on insulin secretion from islets of Langerhans permeabilized by high-voltage discharge
FEBS Proc. Meet. 191, 102-106
- Karin, M. (1992)
Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease
FASEB J. 6, 2.581-2.590
- Katada, T., Amano, T., Ui, M. (1982)
Modulation by islet-activating protein of adenylate cyclase activity in C6 glioma cells
J. Biol. Chem. 257, 3.739-3.746
- Katada, T., Bokoch, G. M., Northup, J. K., Ui, M., Gilman, A. G. (1987)
The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein
J. Biol. Chem. 259, 3.568-3.577
- Katada, T., Ui, M. (1979)
Islet-activating protein. Enhanced insulin secretion and cyclic AMP accumulation in pancreatic islets due to activation of native calcium ionophores
J. Biol. Chem. 254, 469-479

- Katada, T., Ui, M. (1981)
In vitro effects of islet-activating protein on cultured rat pancreatic islets: Enhancement of insulin secretion, adenosine 3',5'-monophosphate accumulation and ^{45}Ca flux
J. Biochem. Tokyo 89, 979-990
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., Satoh, T. (1991)
Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins
Annu. Rev. Biochem. 60, 349-400
- Kieffer, T. J., Buchan, A. M. J., Barker, H., Brown, J. C., Pederson, R. A. (1994)
Release of gastric inhibitory polypeptide from cultured canine endocrine cells
Am. J. Physiol. 267, E489-E496
- Kikkawa, S., Takahashi, K., Shimada, N., Ui, M., Kimura, M., Katada, T. (1990)
Conversion of GDP into GTP by nucleoside diphosphate kinase on the GTP-binding proteins
J. Biol. Chem. 265, 21.536-21.540
- Kim, D., Lewis, D. L., Graziadei, L., Neer, E. J., Bar-Sagi, D., Clapham, D. (1989)
G-protein $\beta\gamma$ -subunits activate the cardiac K^+ channel via phospholipase A_2
Nature 337, 557-560
- Kinane, T. B., Shang, C., FINDER, J. D., Ercolani, L. (1993)
cAMP regulates G-protein α_{12} subunit gene transcription in polarized LLC-PK₁ cells by induction of a CCAAT box nuclear binding factor
J. Biol. Chem. 268, 24.669-24.676
- Kleppe, K., Ohstuka, E., Kleppe, R., Molineux, L., Khorana, H. G. (1971)
Studies on polynucleotides XCVI, Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerase
Journal of Molecular Biology 56, 341-361
- Kleuss, C., Scherübl, H., Hescheler, J., Schultz, G., Wittig, B. (1992)
Different β -subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors
Nature 358, 424-426
- Kloss, H., Verspohl, E. J. (1996)
Beeinflussung der GRP-Wirkung und -Rezeptorzahl durch GIP in INS-1-Zellen
Pharmazie in unserer Zeit 25, 147
- Kolligs, F., Fehmann, H.-C., Göke, R., Göke, B. (1995)
Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide-1 receptor antagonist exendin(9-39)amide
Diabetes 44, 16-19
- Konrad, R. J., Young, R. A., Record, R. D., Smith, R. M., Butkerait, P., Manning, D., Jarett, L., Wolf, B. A. (1995)
The heterotrimeric G-protein G_i is localized to the insulin secretory granules of β -cells and is involved in insulin exocytosis
J. Biol. Chem. 270, 12.869-12.876

- Kotagal, N., Colca, J. R., McDaniel, M. L. (1983)
Activation of an islet cell plasma membrane $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase by calmodulin and Ca-EGTA
J. Biol. Chem. 258, 4.808-4.813
- Kowluru, A., Metz, S. A. (1994)
Regulation of guanine-nucleotide binding proteins in islets subcellular fractions by phospholipase-derived lipid mediators of insulin secretion
Biochim. Biophys. Acta 1222, 360-368
- Kowluru, A., Metz, S. A. (1994 b)
GTP and its binding proteins in the regulation of insulin exocytosis
Molecular Biology of Diabetes, Humana Press Inc., 249-283
- Kowluru, A., Rabaglia, M. E., Muse, K. E., Metz, S. A. (1994)
Subcellular localization and kinetic characterization of guanine nucleotide binding proteins in normal rat and human pancreatic islets and transformed β cells
Biochim. Biophys. Acta 1222, 348-359
- Kowluru, A., Seavey, S. E., Rhodes, C. J., Metz, S. A. (1996)
A novel regulatory mechanism for trimeric GTP-binding proteins in the membrane and secretory granule fraction of human and rodent β -cells
Biochem. J. 313, 97-107
- Kozasa, T., Itoh, H., Tsukamoto, T., Kaziro, Y. (1988)
Isolation and characterization of the human $G_{\alpha s}$ gene
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2081-2085
- LaBarre, J. (1932)
Sur les possibilités d'un traitement du diabétique par l'incrétin
Bull. Acad. R. Med. Belg. 12, 620-634
- Laburthe, M., Couvinau, A., Amiranoff, B., Voisin, T. (1994)
Receptors for regulatory peptides
Baillieres Clin. Endocrinol. Metabol. 8, 77-110
- Lacey, R. J., Cable, H. C., James, R. F., London, N. J., Scarpello, J. H., Morgan, N. G. (1993)
Concentration-dependent effects of adrenaline on the profile of insulin secretion from isolated islets of Langerhans
J. Endocrinol. 138, 555-563
- Lang, J., Boulay, F., Parker, P., Gierschik, P., Wollheim, C. B. (1994)
Regulation of cytosolic calcium and insulin secretion by galanin and ATP receptors: interactions of pertussis-toxin-sensitive and -insensitive signalling pathways
Biochem. J. 303, 885-891
- Lang, J., Nishimoto, I., Okamoto, T., Regazzi, R., Kiraly, C., Weller, U., Wollheim, C. B. (1995)
Direct control of exocytosis by receptor-mediated activation of the heterotrimeric GTPases G_i and G_o or by expression of their active G_{α} subunits
EMBO J. 14, 3.635-3.644

- Laugwitz, K. L., Spicher, K., Schultz, G., Offermanns, S. (1994)
Identification of receptor-activated G proteins: selective immunoprecipitation of photolabeled G protein α subunits
Methods Enzymol. 237, 283-294
- Laychock, S. G. (1990)
Glucose metabolism, second messengers, and insulin secretion
Life Sciences 47, 2.307-2.316
- Lee, C. H., Park, D., Wu, D., Rhee, S. G., Simon, G. I. (1992)
Members of the G_q α subunit gene family activate phospholipase C β isozymes
J. Biol. Chem. 267, 16.044-16.047
- Lee, M. C., Schiffman, S. S., Pappas, T. N. (1994)
Role of neuropeptides in the regulation of feeding behavior: a review of cholecystokinin, bombesin, neuropeptide Y, and galanin
Neurosci. Biobehav. Rev. 18, 313-323
- Lee, M. H., Bell, R. M. (1986)
The lipid binding regulatory domain of protein kinase C: a 32 kDa fragment contains the calcium- and phosphatidylserine-dependent phorbol diester binding activity
J. Biol. Chem. 261, 14.867-14.870
- Lesch, K. P., Aulakh, C. S., Tolliver, T. J., Hill, J. L., Wozozin, B. L., Murphy, D. L. (1991)
Differential effects of long-term lithium and carbamazepine administration on $G\alpha_s$ and $G\alpha_i$ protein in rat brain
Eur. J. Pharmacol. 207, 355-359
- Levine, M. A., Feldman, A. M., Robishaw, J. D., Ladenson, P. W., Ahn, T. G., Moroney, J. F., Smallwood, P. M. (1990)
Influence of thyroid hormone status on expression of genes encoding G-protein subunits in the rat heart
J. Biol. Chem. 265, 3.553-3.560
- Li, P. P., Tam, Y. K., Young, L. T., Warsh, J. J. (1991)
Lithium decreases G_s , G_{i1} and G_{i2} alpha-subunit mRNA levels in rat cortex
Eur. J. Pharmacol. 206, 165-166
- Li, Y., Mende, U., Lewis, C., Neer, E. J. (1996)
Maintenance of cellular levels of G-proteins: different efficiencies of α_s and α_o synthesis in GH₃ cells
Biochem. J. 318, 1.071-1.077
- Liao, J. K., Clarks, S. L. (1995)
Regulation of G-protein α_{i2} subunit expression by oxidized low-density lipoprotein
J. Clin. Invest. 95, 1.457-1.463
- Lindskog, S., Ahrén, B. (1991)
Studies on the mechanism by which galanin inhibits insulin secretion in islets
Eur. J. Pharmacol. 205, 21-27

- Liscovitch, M. (1992)
Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases
TIBS 17, 393-399
- Liscovitch, M., Chalifa-Caspi, V. (1996)
Enzymology of mammalian phospholipases D: in vitro studies
Chem. Phys. Lipids. 80, 37-44
- Loganzo F. Jr., Fletcher, P. W. (1992)
Follicle-stimulating hormone increases guanidine nucleotide-binding regulatory protein subunit α_{13} -mRNA, but decreases α_{11} - and α_{12} -mRNA in Sertoli cells
Mol. Endocrinol. 6, 1.259-1.267
- Lu, M., Wheeler, M., Leng, X.-H., Boyd, A. E. (1993)
The role of free cytosolic calcium level in β -cell signal transduction by gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1(7-37)
Endocrinology 132, 94-100
- Lui, E. Y., Asa, S. L., Drucker, D. J., Lee, Y. C., Brubaker, P. L. (1990)
Glucagon and related peptides in fetal rat hypothalamus in vivo and in vitro
Endocrinology 126, 110-117
- Lund, P.-E., Hellman, B. (1992)
Activation of G-proteins induces Ca^{2+} oscillations with hyperpolarizing K^+ currents in pancreatic β -cells
Sec. Messengers and Phosphoproteins 14, 173-183
- MacKinnon, A. C., Spedding, M., Brown, C. M. (1994)
 α_2 -adrenoceptors: more subtypes but fewer functional differences
TIBS 15, 119-123
- Macrezlepretre, N., Ibarrodo, J., Arnaudeau, S., Morel, J. L., Guillon, G., Mironneau, J. (1995)
A G_{11-2} protein is required for α_{2A} -adrenoceptor-induced stimulation of voltage-dependent Ca^{2+} channels in rat portal vein myocytes
Pflügers Archiv - Eur. J. Physiol. 430, 590-592
- Malaisse, W. J., Malaisse-Lagae, F. (1984)
The role of cyclic AMP in insulin release
Experientia 40, 1068-1074
- Mandel, M., Higa, A. (1970)
Calcium-dependent bacteriophage DNA infection
J. Mol. Biol. 53, 159-162
- Manji, H. K., Lenox, R. H. (1994)
Long-term action of lithium: a role for transcriptional and posttranscriptional factors regulated by protein kinase C
Synapse 16, 11-28
- Manji, H. K., Potter, W. Z., Lenox, R. H. (1995)
Signal transduction pathways: molecular targets for lithium's actions
Arch. Gen. Psychiatry 52, 531-543

- Masana, M. I., Bitran, J. A., Hsiao, J. K., Potter, W. Z. (1992)
In vivo evidence that lithium inactivates G_i modulation of adenylate cyclase in brain
J. Neurochem. 59, 200-205
- Matschinsky, F. M. (1990)
Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes
Diabetes 39, 647-652
- Mayer, R. J., Marshall, L. A. (1993)
New insights on mammalian phospholipase A_2 s; comparison of arachidonoyl-selective and -nonselective enzymes
FASEB J. 7, 339-348
- McClesky, E. W., Fox, A. P., Feldman, D., Tsien, R. W. (1986)
Different types of calcium channels
J. Exp. Biol. 124, 177-190
- McCloskey, M. A., Cahalan, M. D. (1990)
G protein control of potassium channel activity in a mast cell line
J. Gen. Physiol. 95, 205-227
- McDermott, A. M., Sharp, G. W. G. (1993)
Inhibition of insulin secretion: a fail-safe system
Cellular Signalling 5, 229-234
- McDermott, A. M., Sharp, G. W. G. (1995)
 G_{i2} and G_{i3} proteins mediate the inhibition of adenylyl cyclase by galanin in the RINm5F cell
Diabetes 44, 453-459
- McDonald, T. J., Dupre, J., Tatemoto, K., Greenberg, G. R., Radzuik, J., Mutt, U. (1985)
Galanin inhibits insulin secretion and induces hyperglycemia in dogs
Diabetes 34, 192-196
- McGowan, S., Eastwood, S. L., Mead, A., Burnet, P. W. J., Smith, C., Flanigan, T. P., Harrison, P. J. (1996)
Hippocampal and cortical G-protein G_{α_s} -, G_{α_o} - and $G_{\alpha_{i2}}$ -mRNA expression after electroconvulsive shock or lithium carbonate treatment
Eur. J. Pharmacol. 306, 249-255
- McKenzie, F. R., Milligan, G. (1990)
Prostaglandin E1-mediated, cyclic AMP- independent, down-regulation of G_{α_s} in neuroblastoma x glioma hybrid cells
J. Biol. Chem. 265, 17.084-17.093
- McKnight, G. L., Karlsen, A. E., Kowalyk, S., Methewes, S. L., Sheppard, P. O., O'Hara, P. J., Taborsky, G. J. (1992)
Sequence of human galanin and its inhibition of glucose-stimulated insulin secretion from RIN cells
Diabetes 41, 82-87

- Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K., Green, M. R. (1984)
Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter
Nucleic Acids Res. 12, 7035-7036
- Metz, S. A. (1988)
Exogenous arachidonic acid promotes insulin release from intact or permeabilized rat islets by dual mechanism. Putative activation of Ca²⁺ mobilization and protein kinase C
Diabetes 37, 1-453-1.469
- Metz, S. A. (1988 b)
Membrane phospholipid turnover as an intermediary step in insulin secretion. Putative roles of phospholipases in cell signalling
Am. J. Med. 85, 9-21
- Metz, S. A. (1991)
The pancreatic islet as Rubik's Cube. Is phospholipid hydrolysis a piece of the puzzle?
Diabetes 40, 1.565-1.573
- Metz, S. A., Halter, J. B., Robertson, R. P. (1978)
Induction of defective insulin secretion and impaired glucose tolerance by clonidine-selective stimulation of metabolic alpha-adrenergic pathways
Diabetes 27, 554-562
- Metz, S., Robertson, R. P., Leitner, J. W., Draznin, B. (1991)
Phospholipase A₂ in pancreatic beta cells: gene expression of type I enzyme and its regulation in fasting and „glucose toxic“ islets
Clin. Res. 39, 181 A
- Milligan, G., Green, A. (1991)
Agonist control of G-protein levels
Trends Pharmacol. Sci. 12, 207-209
- Moens, K., Heimberg, H., Flamez, D., Huypens, P., Quartier, E., Ling, Z., Pipeleers, D., Gremlich, S., Thorens, B., Schuit, F. (1996)
Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide 1, and glucose-dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells
Diabetes 45, 257-261
- Mojsos, S., Weir, G. C., Habener, J. F. (1987)
Insulinotropin: glucagon-like peptide-1(7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas
J. Clin. Invest. 79, 616-619
- Mojsow, S., Heinrich, G., Wilson, I. B., Ravazzola, M., Orci, L., Habener, J. F. (1986)
Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of posttranslational processing
J. Biol. Chem. 261, 11.880-11.889

- Mojsow, S., Kopczynski, M. G., Habener, J. F. (1990)
Both amidated and nonamidated forms of glucagon-like peptide-1 are synthesized in rat intestine and the pancreas
J. Biol. Chem. 265, 8.001-8.008
- Montminy, M. R., Gonzalez, G. A., Yamamoto, K. K. (1990)
Characteristics of the cAMP response unit
Metabolism 39 Suppl. 2, 6-12
- Morgan, C. R., Lazarow, A. (1963)
Immunoassay of insulin: two-antibody system. Plasma insulin levels of normal, subdiabetic rats
Diabetes 12, 115-116
- Moriarty, T. M., Padrell, E., Carty, D. J., Omri, G., Landau, E. M., Iyengar, R. (1990)
G_o protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive phosphatidylinositol pathway
Nature 343, 79-82
- Moxham, C. M., Hod, Y., Malbon, C. C. (1993)
G α_{i2} mediates the inhibitory regulation of adenylyl cyclase in vivo: analysis in transgenic mice with G α_{i2} suppressed by inducible antisense RNA
Dev. Genet. 14, 266-273
- Müller, F. U., Boheler, K. R., Eschenhagen, T., Schmitz, W., Scholz, H. (1993)
Isoprenaline stimulates gene transcription of the inhibitory G-protein α -subunit G α_{i2} in rat heart
Circulation Research 72, 696-700
- Müller, F. U., Boknick, P., Horst, A., Knapp, J., Linck, B., Schmitz, W., Vahlensieck, U., Walter, A. (1995)
In vivo isoproterenol treatment leads to downregulation of the mRNA encoding the cAMP response element binding protein in the rat heart
Biochemical and Biophysical Research Communications 215, 1.043-1.049
- Müller, F. U., Eschenhagen, T., Reidemeister, A., Schmitz, W., Scholz, H. (1994)
In vivo β -adrenergic stimulation leads to biphasic regulation of G α_{i2} gene transcriptional activity in rat heart
J. Mol. Cell. Cardiol. 26, 869-875
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987)
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction
Methods Enzymol. 155, 335-350
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R., Horn, G. T., Erlich, H. (1986)
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 263-273
- Nauck, M. A., Heimesaat, M. M., Ørskov, C., Holst, J. J., Ebert, R., Creutzfeld, W. (1993)
Preserved incretin activity of GLP-1(7-36)amide but not of synthetic human GIP in patients with type 2-diabetes mellitus
J. Clin. Invest. 91, 301-307

- Nauck, M. A., Kleine, N., Ørskov, C., Holst, J. J., Willms, B., Creutzfeld, W. (1993)
Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide-1(7-36)amide in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients
Diabetologia 36, 741-744
- Neubig, R. R. (1994)
Membrane organization in G-protein mechanisms
FASEB J. 8, 939-946
- Newgard, C. B., Ferber, S., Quaade, C., Johnson, J. H., Hughes, S. D. (1994)
Molecular engineering of glucose-regulated insulin secretion
Molecular Biology of Diabetes, 119-154, Humana Press Inc., Totowa, NJ
- Neye, H. (1996)
Beeinflussung der Insulin-mRNA durch Hormone und Tyrosinkinaseinhibitoren
Dissertation Universität Münster
- Niddam, R., Angel, I., Bidet, S., Langer, S. Z. (1990)
Pharmacological characterization of α_2 -adrenoergic receptor subtype involved in the release of insulin from isolated rat pancreatic islets
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 254, 883-887
- Nigg, E. A., Hilz, H., Eppenberger, H. M., Dutley, F. (1985)
Rapid and reversible translocation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase type II from the Golgi complex to the nucleus
EMBO J. 4, 2.801-2.806
- Northup, J. K., Sternweis, P. C., Smigel, M. D., Schleifer, L. S., Ross, E. M., Gilman, A. G. (1980)
Purification of the regulatory component of adenylate cyclase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6.516-6.520
- Nuoffer, C., Balch, W. E. (1994)
GTPases: multifunctional molecular switches regulating vesicular traffic
Ann. Rev. Biochem. 63, 949-990
- O'Dorisio, T., Cataland, S., Stevenson, M., Mazzaferri, E. (1976)
Gastric inhibitory polypeptide (GIP): intestinal distribution and stimulation by amino acid and medium chain triglycerides
Dig. Dis. 21, 761-765
- Offermanns, S., Schultz, G. (1994)
What are the functions of the pertussis toxin-insensitive G-proteins G_{12} , G_{13} and G_Z ?
Mol. Cell. Endocrin. 100, 71-74
- Oishi, M., Cosloy, S.D. (1972)
The genetic and biochemical basis of the transformability of *Escherichia coli* K 12
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 1568-1572

- Olmos, G., Kulkarni, R. N., Haque, M., MacDermot, J. (1994)
Imidazolines stimulate release of insulin from RIN-5AH cells independently from imidazoline I₁ and I₂ receptors
Eur. J. Pharmacol. 262, 41-48
- Ørskov, C., Bersani, M., Johnsen, A. H., Hojrup, P., Holst, J. J. (1989)
Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine
J. Biol. Chem. 264, 12.826-12.829
- Ørskov, C., Holst, J. J., Knuhtsen, S., Baldissera, F. G., Poulsen, S. S., Nielsen, O. V. (1986)
Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas
Endocrinology 119, 1.467-1.475
- Ørskov, C., Rabenhøj, L., Wettergren, A., Kofod, H., Holst, J. J. (1994)
Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide-1 in humans
Diabetes 43, 535-539
- Panet, A., Khorana, H. G. (1974)
Studies on polynucleotides, the linkage of deoxyribopolynucleotide templates to cellulose and its use in their replication
Journal of Biological Chemistry 249, 5213-5221
- Patzelt, C., Schlitz, E. (1984)
Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5.007-5.011
- Paulssen, E. J., Paulssen, R. H., Haugen, T. B., Gautvik, K. M., Gordeladze, J. O. (1991)
Regulation of G protein mRNA levels by thyroliberin, vasoactive intestinal peptide and somatostatin in prolactin-producing rat pituitary adenoma cells
Acta Physiol. Scand. 143, 195-201
- Pederson, R. A., Brown, J. C. (1976)
The insulinotropic action of gastric inhibitory polypeptide in the perfused isolated rat pancreas
Endocrinology 99, 780-785
- Persaud, S. J., Jones, P. M., Howell, S. L. (1989)
Effects of Bordetella pertussis toxin on catecholamine inhibition of insulin release from intact and electrically permeabilized rat islets
Biochem. J. 258, 669-675
- Persaud, S. J., Jones, P. M., Howell, S. L. (1990)
Glucose-stimulated insulin secretion is not dependent on activation of protein kinase A
Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 833-839
- Pfeuffer, T. (1977)
GTP-binding proteins in membranes and control of adenylate cyclase activity
J. Biol. Chem. 252, 7.224-7.234

- Pipeleers, D. G., Schuit, F. C., in't Veld, P. A., Maes, E., Hooghe-Peters, E. L., Van de Winkel, M., Gepts, W. (1985)
Interplay of nutrients and hormones in the regulation of insulin release
Endocrinology 117, 824-833
- Polak, J. M., Bloom, S. R., Kuzio, M., Brown, J. C., Pearse, A. G. E. (1973)
Cellular localization of gastric inhibitory polypeptide in the duodenum and jejunum
Gut 14, 284-288
- Porte, D. Jr., Giradier, L., Seydoux, J., Kanazawa, Y., Pasternak, J. (1973)
Neural regulation of insulin secretion in the dog
J. Clin. Invest. 52, 210-214
- Porte, D. Jr., Williams, R. H. (1966)
Inhibition of insulin release by norepinephrine in man
Science 152, 1.248-1.250
- Prentki, M., Matschinsky, F. M. (1987)
 Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion
Physiol. Rev. 67, 1.185-1.248
- Pronin, A. N., Gautam, N. (1992)
Interaction between G-protein β and γ subunit types is selective
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6.220-6.224
- Rasenick, M. M. (1992)
Gs
TIBS 17, 71
- Rasmussen, H., Isales, C. M., Calle, R., Throckmorton, D., Anderson, M., Gasalla-Herraiz, J., McCarthy, P. (1995)
Diacylglycerol production, Ca^{2+} influx, and protein kinase C activation in sustained cellular responses
Endocrine Reviews 16, 649-681
- Rasmussen, H., Zawalich, K. C., Zawalich, W. S. (1995)
Metabolic activation of Ca^{2+} -independent phosphoinositide hydrolysis in β -cells and its role in the control of insulin secretion
Endocrinology 136, 577-584
- Reithmann, C., Gierschik, P., Werdan, K., Jakobs, K. H. (1990)
Hormonal regulation of $G_i\alpha$ level and adenylyl cyclase responsiveness
Br. J. Clin. Pharmacol. 30, 118S-120S
- Remaury, A., Paris, H. (1992)
The insulin-secreting cell line RINm5F expresses an alpha-2D adrenoceptor and nonadrenergic idazoxan-binding sites
J. Pharmacol. Exp. Ther. 260, 417-426
- Renstrom, E., Ding, W. G., Bokvist, K., Rorsman, P. (1996)
Neurotransmitter induced inhibition of exocytosis in insulin secretion β -cells by activation of calcineurin
Neuron 17, 513-522

- Rhee, S. G., Choi, K. D. (1992)
Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes
J. Biol. Chem. 267, 12.393-12.396
- Richter, G., Feddersen, O., Wagner, U., Barth, P., Göke, R., Göke, B. (1993)
GLP-1 stimulates secretion of macromolecules and relaxes pulmonary artery
A. J. Physiol. 265, L374-L381
- Richter, G., Göke, R., Göke, B., Arnold, R. (1990)
Characterization of receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat lung membranes
FEBS Lett. 267, 78-80
- Risby, E. D., Hsiao, J. K., Manji, H. K., Bitran, J., Moses, F., Zhou, D. F., Potter W. Z. (1991)
The mechanism of action of lithium II. Effects on adenylate cyclase activity and beta-adrenergic receptor binding in normal subjects
Arch. Gen. Psychiatry 48, 513-524
- Rodbell, M. (1992)
The role of GTP-binding proteins in signal transduction: from the sublimely simple to the conceptually complex
Cur. Topics Cell. Reg. 32, 1-47
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L., Krans, H. M. J. (1971)
The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon actions
J. Biol. Chem. 246, 1.877-1.882
- Roesler, W. J., Vanderbork, G. R., Hanson, R. W. (1988)
Cyclic AMP and the induction of eucaryotic gene transcription
J. Biol. Chem. 263, 9.063-9.066
- Rorsman, P., Bokvist, K., Ämmälä, C., Arkhammar, P., Berggren, P. O. Larsson, O., Wahlander, K. (1991)
Activation by adrenaline of a low-conductance G protein-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic B cells
Nature 349, 77
- Rosetti, L. (1989)
Normalization of insulin sensitivity with lithium in diabetic rats
Diabetes 38, 648-652
- Ross, E. M., Gilman, A. G. (1977)
Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase activity: interactions of solubilized components with receptor-replete membranes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3.715-3.719
- Ruiz-Grande, C., Alarcon, C., Merida, E., Valverde, I. (1992)
Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes
Peptides 13, 13-16

- Rushakoff, R. J., Liddle, R. A., Williams, J. A., Goldfine, I. D. (1990)
The role of cholecystokinin and other gut peptides on regulation of postprandial glucose and insulin levels
Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 92: Insulin, 113-124, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Saha, S., Hellman, B. (1995)
 α_2 -adrenergic stimulation counteracts glucose-induced rise of sodium in pancreatic islets exposed to ouabain
Acta Diabetol. 32, 82-85
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988)
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase
Science 239, 487-491
- Saito, N., Guitart, X., Hayward, M., Tallman, J. F., Duman, R. S., Nestler, E. J. (1989)
Corticosterone differentially regulates the expression of $G_s\alpha$ - and $G_i\alpha$ -mRNA and protein in rat cerebral cortex
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3.906-3.910
- Sala, S., Matteson, D. R. (1990)
Single-channel recordings of the two types of calcium channels in rat pancreatic β -cells
Biophys. J. 58, 567-571
- Sato, M., Kataoka, R., Dingus, J., Wilcox, M., Hildebrandt, J. D., Lanier, S. M. (1995)
Factors determining specificity of signal transduction by G-protein-coupled receptors
J. Biol. Chem. 270, 15.269-15.276
- Savarese, T. M., Fraser, C. M. (1992)
In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors
Biochem J. 283, 1-19
- Schattenmann, G., Ebert, R., Sievert, J. R., Creutzfeld, W. (1984)
Different response of gastric inhibitory polypeptide to glucose and fat from duodenum and jejunum
Scand. J. Gastroenterol. 19, 260-266
- Schlegel, W., Kempner, E., Rodbell, M. (1979)
Activation of adenylyl cyclase in hepatic membranes involves interaction of the catalytic subunit with multimeric complexes of regulatory proteins
J. Biol. Chem. 254, 5.168-5.176
- Schmidt, A., Hescheler, J., Offermanns, S., Spicher, K., Hinsch, K. D., Klinz, F. J., Codina, J., Birnbaumer, L., Gausepohl, H., Frank, R. (1991)
Involvement of pertussis toxin-sensitive G-proteins in the hormonal inhibition of dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} currents in an insulin-secreting cell line (RINm5F)
J. Biol. Chem. 266, 18025-18033

- Schultz, G., Hescheler, J. (1993)
Hormonal modulations of calcium channel activity
Drug Res. 43, 229-232
- Schultz, G., Rosenthal, W., Trautwein, W., Hescheler, J. (1990)
Role of G proteins in calcium channel modulation
Annu. Rev. Physiol. 52, 275-292
- Schulz, A., Hasselblatt, A. (1989)
Dual action of clonidine on insulin release: suppression, but stimulation when α_2 -adrenoceptors are blocked
Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol. 340, 712-714
- Seaquist, E. R., Robertson-Neal, A., Shoger, K. D., Walseth, T. F., Robertson, R. P. (1992)
G-proteins and hormonal inhibition of insulin secretion from HIT-T15 cells and isolated rat islets
Diabetes 41, 1390-1399
- Shah, J. H., Pishdad, G. (1980)
The effect of lithium on glucose- and tolbutamide-induced insulin release and glucose-tolerance in the intact rat
Endocrinology 107, 1.300-1.304
- Sharp, G. W. G., Le Marchand-Brustel, Y., Yada, T., Russow, L. L., Bliss, C. R., Cormont, M., Monge, L., Van Obberghen, E. (1989)
Galanin can inhibit insulin release by a mechanism other than membrane hyperpolarization or inhibition of adenylate cyclase
J. Biol. Chem. 264, 7.302-7.309
- Shimosegawa, T., Moriizumi, S., Koizumi, M., Kashimura, J., Yanaihara, N., Toyota, T. (1992)
Immunohistochemical demonstration of galanin like immunoreactive nerves in the human pancreas
Gastroenterology 102, 263-271
- Simon, M. I., Strathmann, M. P., Gautam, N. (1991)
Diversity of G proteins in signal transduction
Science 252,802-808
- Simonds, W. F., Butrynski, J. E., Gautam, N., Unson, C. B., Spiegel, A. M. (1991)
G-protein $\beta\gamma$ -dimers. Membrane targeting requires subunit coexpression and intact gamma CAAX domain
J. Biol. Chem. 266, 5.363-5.366
- Skoglund, G., Basmaciogullari, A., Ferrand, N., Rosselin, G. (1995)
Differential distribution of G protein α -subunits in the endocrine cells of the islet of Langerhans
Abstracts of the 31st annual meeting of the EASD, Stockholm
- Southern E. M. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis
J. Mol. Biol. 98, 503-517

- Stabel, S. (1994)
Protein kinase C - an enzyme and its relatives
Semin. Cancer Biol. 5, 277-284
- Sternweis, P. C., Northup, J. K., Smigel, M. D., Gilman, A. G. (1981)
The regulatory component of adenylate cyclase. Purification and properties
J. Biol. Chem. 256, 11.517-11.526
- Strader, C. D., Candelore, M. R., Hill, W. S., Sigal, I. S., Dixon, R. A. F. (1989)
Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the beta-adrenergic receptor have different roles in receptor function
J. Biol. Chem. 263, 10.267-10.271
- Strader, C. D., Fong, T. M., Graziano, M. P., Tota, M. R. (1995)
The family of G-protein-coupled receptors
FASEB J. 9, 745-754
- Straub, S. G., Sharp, G. W. G. (1996)
Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulates insulin secretion via increased cyclic AMP and $[Ca^{2+}]_i$ and a wortmannin sensitive signalling pathway
Biochem. Biophys. Res. Commun. 224, 369-374
- Svoboda, M., Garcia-Morales, P., Dufrane, S. P., Sener, A., Valverde, I., Christophe, J., Malaisse, W. J. (1985)
Stimulation by cholera toxin of ADP-ribosylation of membrane proteins, adenylate cyclase and insulin release in pancreatic islets
Cell Biochem. Funct. 3, 25-32
- Szeczówka, J., Grill, V., Sandberg, E., Efendic, S. (1982)
Effect of GIP on the secretion of insulin and somatostatin and the accumulation of cyclic AMP in vitro and in the rat
Acta Endocrinol. 99, 416-421
- Tabor, S., Richardson, C. C. (1985)
A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes
Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 1074-1078
- Tatemoto, K., Rökaeus, A., Jornvall, H., McDonald, T. J., Mutt, V. (1983)
Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine
FEBS Lett. 164, 124-128
- Taussig, R., Gilman, A. G. (1995)
Mammalian membrane-bound adenylylcyclases
J. Biol. Chem. 270, 1-4
- Taylor, S. J., Chae, H. Z., Rhee, S. G., Exton, J. H. (1991)
Activation of the $\beta 1$ isozyme of phospholipase C by α subunits of the G_q class of G proteins
Nature 350, 516-518

- Terashima, T., Katada, T., Oinuma, M., Inoue, Y., Ui, M. (1987)
Endocrine cells in pancreatic islets of Langerhans are immunoreactive to antibody against guanine nucleotide-binding protein (Go) purified from rat brain
Brain Res. 417, 190-194
- Thams, P., Capito, K., Hedekov, C. J., Kofod, H. (1990)
Phorbol ester induced down-regulation of protein kinase C in mouse pancreatic islets
Biochem. J. 265, 777-787
- Thams, P., Capito, K., Hedekow, C. J. (1988)
Stimulation by glucose of cyclic AMP accumulation in mouse pancreatic islets is mediated by protein kinase C
Biochem. J. 253, 229-234
- Thomas, F., Mazzaferri, E., Crockett, S., Mekhjian, H., Gruemer, H., Cataland, S. (1976)
Stimulation of secretion of gastric inhibitory polypeptide and insulin by intraduodenal amino acid perfusion
Gastroenterology 70, 523-527
- Thomas, F., Sinar, D., Mazzaferri, E., Cataland, S., Mekhjian, H., Caldwell, J., Fromkes, J. (1978)
Selective release of gastric inhibitory polypeptide by intraduodenal amino acid perfusion in man
Gastroenterology 74, 1.261-1.265
- Thompson, M. A., Ginty, D. D., Bonni, A., Greenberg, M. E. (1995)
L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channel activation regulates *c-fos* transcription at multiple levels
J. Biol. Chem. 270, 4.224-4.235
- Thorens, B. (1992)
Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide-1
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 8.641-8.645
- Thorens, B. (1994)
The gluco-incretin hormone glucagon-like peptide-1 and its β -cell receptor
Molecular Biology of Diabetes, 357-379, Humana Press Inc., Totawa, NJ
- Thorens, B., Sarkar, H. K., Kaback, H. R., Lodish, H. F. (1988)
Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells
Cell 55, 281-290
- Turk, J., Colca, J. R., Kotagal, N., McDaniel, M. L. (1984)
Arachidonic acid metabolism in isolated pancreatic islets. The effects of glucose and inhibitors of arachidonate metabolism on insulin secretion and metabolite synthesis
Biochim. Biophys. Acta 794, 125-136
- Ullrich, S., Wollheim, C. B. (1988)
GTP-dependent inhibition of insulin secretion by epinephrine in permeabilized RINm5F cells
J. Biol. Chem. 263, 8.615-8.620

- Ullrich, S., Wollheim, C. B. (1989)
Galanin inhibits insulin secretion by direct interference with exocytosis
FEBS Lett. 247, 401-404
- Unger, R. H., Eisentraut, A. M. (1969)
Entero-insular axis
Arch. Intern. Med. 123, 261-266
- Usdin, T. B., Mezey, E., Button, D. C., Brownstein, M. J., Bonner, T. I. (1993)
Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain
Endocrinology 133, 2.861-2.870
- Valerio, A., Tinti, C., Alberici, A., Belloni, M., Buonamici, M., Spano, P. F., Memo, M. (1993)
Deafferentation induces early and delayed differential changes in the pattern of expression of the various guanine nucleotide binding protein mRNAs in rat striatum
Neuroscience Letters, 164, 109-112
- Vendsborg, P. B., Rafaelsen, O. J. (1973)
Lithium in man: effect on glucose tolerance and serum electrolytes
Acta Psychiatr. Scand. 49, 601-610
- Verspohl, E. J., Tacke, R., Mutschler, E., Lambrecht, G. (1990)
Muscarinic receptor subtypes in rat pancreatic islets: binding and functional studies
Eur. J. Pharmacol. 178, 303-311
- Volz, A., Göke, R., Lankatbuttgerit, B., Fehmann, H.-C., Bode, H. P., Göke, B. (1995)
Molecular cloning, functional expression, and signal transduction of the GIP-receptor cloned from human insulinoma
FEBS Lett. 373, 23-29
- Waeber, G., Thompson, N., Waeber, B., Brunner, H.R., Nicod, P., Grouzmann, E. (1993)
Neuropeptide Y expression and regulation in a differentiated rat insulin-secreting cell line
Endocrinology 133, 1061-1067
- Wahl, M. A., Plehn, R. J., Landsbeck, E. A., Verspohl, E. J., Ammon, H. P. T. (1992)
Are ionic fluxes of pancreatic beta cells a target for gastric inhibitory polypeptide?
Mol. Cell. Endocrinol. 90, 117-123
- Walseth, T. F., Zhang, H.-J., Olson, L. K., Schroeder, W. A., Robertson, R. P. (1989)
Increase in Gs and cyclic AMP generation in HIT cells
L. Biol. Chem. 264, 1106-1111
- Watkins, D. C., Moxham, C. M., Morris, A. J., Malbon, C. C. (1994)
Suppression of G α_{i2} enhances phospholipase C signalling
Biochem. J. 299, 593-596
- Watson, J. B., Coulter, P. M., Margulies, J. E., de Lecea, L., Danielson, P. E., Erlander, M. G., Sutcliffe, J. G. (1994)
G-protein γ_7 subunit is selectively expressed in medium-sized neurons and dendrites of the rat neostriatum
J. Neurosci. Res. 39, 108-116

- Weinstein, L. S., Spiegel, A. M., Carter, A. D. (1988)
Cloning and characterization of the human gene for the α -subunit of G_{12} , a GTP-binding signal transduction protein
FEBS Letters 232, 333-340
- Wheeler, M. B., Gelling, R. W., McIntosh, C. H. S., Gergiou, J., Brown, J. C., Pederson, R. A. (1995)
Functional expression of the rat pancreatic islet glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor: ligand binding and intracellular signaling properties
Endocrinology 136, 4.629-4.639
- Widmann, C., Bürki, E., Dolci, W., Thorens, B. (1994)
Signal transduction by the cloned glucagon-like peptide-1 receptor: comparison with signaling by the endogenous receptors of β cell lines
Mol. Pharmacol. 45, 1.029-1.035
- Widmann, C., Dolci, W., Thorens, B. (1996)
Desensitization and phosphorylation of the glucagon-like-peptide-1 (GLP-1) receptor by GLP-1 and 4-phorbol-12-myristate-13-acetate
Molecular Endocrinology 10, 62-75
- Wieland, T., Nürnberg, B., Ulibarri, I., Kaldanberg-Stasch, S., Schultz, G., Jakobs, K. H. (1993)
Guanine nucleotide-specific phosphate transfer by guanine nucleotide-binding regulatory protein β -subunits. Characterization of the phosphorylated amino acid
J. Biol. Chem. 268, 18.111-18.118
- Wilson, E. J. (1984)
Regulation of mammalian hexokinase activity
Regulation of Carbohydrate Metabolism, 45-85, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.
- Wollheim, C. B., Kikuchi, M., Renold, A. E., Sharp, G. W. G. (1977)
Somatostatin and epinephrine-induced modifications of ^{45}Ca fluxes and insulin release in rat pancreatic islets maintained in tissue culture
J. Clin. Invest. 60, 1.165-1.173
- Yada, T., Itho, K., Nakata, M. (1993)
Glucagon-like peptide-1(7-36)amide in adenosine 3',5'-monophosphate increase cytosolic free Ca^{2+} in rat pancreatic β -cells by enhancing Ca^{2+} channel activity
Endocrinology 133, 1685-1692
- Yamaguchi, N. (1992)
Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas, and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress
Can. J. Physiol. Pharmacol. 70, 167-206
- Yatani, A., Brown, A. M. (1989)
Rapid β -adrenergic modulation of calcium channel currents by a fast G protein pathway
Science 245, 71-74

- Yatani, A., Codina, J., Brown, A. M., Birnbaumer, L. (1987)
Direct activation of mammalian atrial muscarinic potassium channels by GTP regulatory protein G_k
Science 235, 207-211
- Zawalich, W. S., Rasmussen, H. (1990)
Control of insulin secretion: a model involving Ca^{2+} , cAMP, and diacylglycerol
Mol. Cell. Endocrinol. 70, 119-137
- Zawalich, W. S., Zawalich, K. C. (1996)
Regulation of insulin secretion by phospholipase C
Am. J. Physiol. 271, E409-E416
- Zawalich, W. S., Zawalich, K. C., Rasmussen, H. (1989)
Cholinergic agonists prime the β -cell to glucose stimulation
Endocrinology 125, 2.400-2.406
- Zawalich, W. S., Zawalich, K. C., Rasmussen, H. (1989b)
Interaction between lithium, inositol and mono-oleoylglycerol in the regulation of insulin secretion from isolated perfused rat islets
Biochem. J. 262, 557-561
- Zigman, J. M., Westermark, G. T., LaMendola, J., Steiner, D. F. (1994)
Expression of cone transducin, $G_z\alpha$, and other G-protein α -subunit messenger ribonucleic acids in pancreatic islets
Endocrinology 135, 31-37

8 ANHANG

Gs

I think that I shall never see
A protein lovelier than a G.
GS, Gi, transducin too
Each one it seems, has much to do.

Ef tu and tubulin
Are G proteins as well.
As genes for new Gs are fished out,
The list indeed does swell.

G proteins give us IP3
And also cyclic A.
They turn off cyclases rather well,
And take cyclic G away.

Several ion channels may
By G proteins be gated.
It looks like many leukocytes
Through Gs are activated.

Some Gs act as oncogenes,
Controlling how cells grow.
Others manage how cell proteins
Do shuttle to and fro.

Gs even act as matchmakers
For copulating yeast.
Others control the process how
From cells, things are released.

It seems that there is nothing that
G proteins cannot do.
Come up with a new function and
We'll find the G for you.

So don't depredate G proteins or
You'll get me quite annoyed.
Since another function of them is
To keep us, happily, employed.

Mark M. Rasenick (1992)

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. J. Verspohl am Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster von Januar 1994 bis November 1996 angefertigt.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits auszugsweise veröffentlicht:

S. Kesper, E. J. Verspohl (1996)

Regulation der mRNA von G-Protein- α -Untereinheiten in INS-1 Zellen
Pharmazie in unserer Zeit 25, 142

S. Kesper, E. J. Verspohl (1997)

Chronic exposure of INS-1 cells to several agonists for G-protein coupled receptors leads to regulation of G-protein α -subunit mRNA levels and in parallel to modulation of insulin secretion

Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 104, A14

S. Kesper, E. J. Verspohl (1997)

G α_{i2} -mRNA regulation as a mechanism for heterologous desensitization of insulin secretion in INS-1 cells

Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 355 Suppl., R 56

Neben meiner Dissertation war ich an Untersuchungen der folgenden Publikation beteiligt:

S. C. Bögge, S. Kesper, E. J. Verspohl, A. Nahrstedt

Reduction of ACh-induced contraction of rat isolated ileum by coptisine, (+)-caffeoylmalic acid, *Chelidonium majus*, and *Corydalis lutea* extracts

Planta Med. 62, 173-174