Aus dem Med. Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold
Abteilung für Gastroenterologie, Stoffwechselkrankheiten und Endokrinologie
Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold

Die differentielle Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase und der Proteinkinase B/Akt durch Insulin, IGF-1 und Glucagon-like-peptide-1 in der β-Zell-Linie INS-1

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

vorgelegt dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

von
Katja Irene Paula Trümper
aus Fritzlar

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am 13.11.2002 - gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. Rudolf Arnold

1. Correferent: Prof. Dr. K. Voigt/ Philipps-Universität Marburg
2. Correferent: Prof. Dr. med. R. Bretzel/ Justus-Liebig Universität Gießen

Meinen Schwestern und Kolleginnen

Andrea und Jutta

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung 6

1. Diabetes mellitus 6

1.1. Geschichte des Diabetes mellitus **6**
1.2. Ätiologie und Klassifikation **6**
1.3. Klinisches Erscheinungsbild **9**
1.4. Therapie **10**

2. Tiermodelle des Diabetes mellitus Typ II 11
3. Wachstumsfaktoren für b-Zellen 13
4. Glucagon-like-peptide-1 (Glucagon-ähnliches –Peptid-1) 14
5. Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) und Insulin 16
6. Signaltransduktionswege der b- Zelle 18
6.1. Signalübertragung am GLP-1 Rezeptor **18**
6.2. Signalübertragung am Insulin- und IGF-1 Rezeptor
6.2.1. Der Insulinrezeptor und der IGF-1 Rezeptor **19**
6.2.2. Insulinrezeptor-Substrat (IRS) Isoformen **20**
6.2.3. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) **20**
6.2.4. Proteinkinase B (PKB) **21**

7. Ziel der Arbeit 23

B Material und Methoden 25

1. Material 25
2. Zusammensetzung der Reagenzien 26
3. Zellkultur 27
4. Proliferationsmessung 28
5. Apoptosemessung 28
6. Immunopräzipitation und Immunoblotting 29
7. PI3K – Aktivitätsmessung 30
8. PKB Assay 31

C Ergebnisse 32

1. Proliferative Effekte von Insulin, IGF-1 und GLP-1 32
2. Antiapoptotische Wirkung von Insulin, IGF-1 und GLP-1 33
3. Proteinkinase B/ Akt Isoformen 35
4. Zeitverlauf der PKB/ Akt Phosphorylierung 35
5. Dosisabhängigkeit der PKB/ Akt Phosphorylierung 37
6. Glucoseabhängigkeit der PKB/ Akt Aktivität 39
7. Serinkinase- Aktivität der PKB/ Akt 41

8. Effekte von PKB/ Akt Mutanten auf die metabolische Aktivität von INS-1 Zellen 42
8. Phosphorylierung von IRS-Isoformen und PI3K Aktivierung 43
9. Mechanismen der PKB/ Akt Aktivierung in INS-1 Zellen 46
10. Glucoseabhängigkeit der PI3K Aktivierung 48
11. Zeitverlauf der PI3K Aktivierung 50

D Diskussion 53

1. Medizinische Bedeutung von Wachstumsfaktoren für b - Zellen 53
2. Wachstumsfaktoren für b - Zellen 54
3. Signaltransduktionsmodule in b - Zellen 54
4. Proliferation und Apoptose in INS-1 Zellen 55
5. PKB/ Akt Phosphorylierung in INS-1 Zellen 57
6. Molekulare Wirkung von Insulin, IGF-1 und GLP-1 in INS-1 Zellen 60
7. Schlussfolgerung 62

E Zusammenfassung 64

F Literaturverzeichnis 65

G Anhang 83

1. Verwendete Abkürzungen 83
2. Akademische Lehrer 84
3. Lebenslauf 85
4. Ehrenwörtliche Erklärung 87
5. Danksagung 88

A Einleitung

1. Diabetes mellitus

1.1 Geschichte des Diabetes mellitus

Der lateinisch-griechische Name „Diabetes mellitus“ bedeutet „honigsüßer Durchfluss“. Schon vor über 3.500 Jahren wurden die Krankheitssymptome des Diabetes mellitus in den von dem Ägyptologen George Ebers entdeckten „Papyrus Ebers“ beschrieben (Schneider T 1972). Auch von römischen, griechischen und indischen Ärzten wurde diese Erkrankung schon vor zwei Jahrtausenden beschrieben. Allerdings wurde über 2000 Jahre lang geglaubt, es handele sich um eine Erkrankung der Nieren. Erst 1869 entdeckte Paul Langerhans die endokrinen Inseln der Bauchspeicheldrüse. Dennoch vergingen weitere 20 Jahre bis durch Minkowski die Fehlfunktion der Bauchspeicheldrüse als Krankheitsursache des Diabetes mellitus erkannt wurde. Mit der 1921 durch Banting und Best erfolgten bahnbrechenden Entdeckung des Insulins, war nicht nur das den Glucosehaushalt regulierende Hormon, sondern auch eine suffiziente Therapiemöglichkeit gefunden worden (Banting FG, Best CH, Macleod JJR 1922; Goldfine ID, Youngren JF, 1998).

1.2. Ätiologie und Klassifikation

Mit dem Begriff Diabetes mellitus wird eine heterogene Gruppe von Erkrankungen zusammengefaßt, deren Gemeinsamkeit eine Störung des Kohlenhydratstoffwechsels ist.

Das Charakteristikum ist ein inadäquat hoher Blutglucosespiegel nüchtern und postprandial. Zur Zeit wird der Diabetes mellitus durch die WHO in vier Kategorien eingeteilt : Diabetes mellitus Typ I, Diabetes mellitus Typ II, Gestationsdiabetes und andere spezifische Typen, deren Ursache bekannt ist (Alberti KG, Zimmet PZ 1998).

Beim **Diabetes mellitus Typ I** entwickelt sich durch autoimmune oder idiopathische Zerstörung der β-Zellen ein absoluter Insulinmangel. Ein Hinweis für die autoimmune Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I ist das Auftreten von Autoantikörpern gegen Proinsulin, Insulin, Inselzellen und gegen die Glutamat- Decarboxylase der β-Zellen. Neben einer Beteiligung von Umweltfaktoren, wie Viren, Stress und Nahrungsbestandteilen, wird auch eine genetische Prädisposition als Entstehungsursache angenommen. Varianten verschiedener Genloci beinhalten für den Träger ein erhöhtes Risiko, an Diabetes mellitus Typ I zu erkranken. Darunter fallen

beispielsweise die HLA (humanes Leukozyten Antigen)-Antigene DR 3 und DR 4, die über 90% der Erkrankten besitzen (Müller-Wieland D, Häring HU 2001).

Über 90% der diabetischen Patienten leiden an **Diabetes mellitus Typ II.** Die kumulative Inzidenz des Diabetes mellitus Typ II liegt bei 6 bis 10 % der Bevölkerung bei Hochrechnung zum achtzigsten Lebensjahr (Gerbert G, Thomas C 1992). Bei der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ II handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen. Wie an Zwillingsstudien gezeigt werden konnte, besteht eine stark ausgeprägte genetischen Disposition (Medici F et al. 1999). Es konnten verschiedene Genloci ermittelt werden, die eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit für Diabetes mellitus Typ II beinhalten (Wiltshire S et al. 2001). Ein einzelnes „Diabetesgen" konnte bisher nicht gefunden werden, daher werden als Entstehungsursache polygenetische Effekte angenommen (Müller-Wieland D, Häring HU 2001). Auch verschiedene Umweltfaktoren nehmen Einfluss auf das Auftreten und die Ausprägung der Erkrankung. Gerade das Körpergewicht stellt einen entscheidenden Risikofaktor dar: 80% der Patienten mit Diabetes mellitus Typ II leiden an Adipositas. Leiden die Patienten neben Adipositas und Glucoseintoleranz zusätzlich an Bluthochdruck, Hypertriglyceridämie und einem erniedrigten HDL-Cholestrolspiegel im Blut wird dieser Symptomkomplex als „metabolisches Syndrom" zusammengefasst. Sind die Patienten zu einer Gewichtsreduktion fähig, kann es zur vollständigen Rückbildung aller Symptome kommen. Der Diabetes mellitus Typ II wird in die Typen II a und II b unterschieden. Im Gegensatz zu den adipösen Typ II b Diabetikern sind Patienten mit Typ II a normalgewichtig.

Die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ II ist hauptsächlich durch eine Insulinresistenz der insulinabhängigen Gewebe Leber, Fettgewebe und Muskulatur gekennzeichnet.

Die Ursache der Hormonresistenz ist eine gestörte Insulinrezeptorsignal-transduktion. Bei einigen Patienten konnten direkt Mutationen einzelner Signalmodule (beispielsweise des Insulinrezeptors) in der Insulinrezeptorsignal-transduktion festgestellt werden, aber dabei handelt es sich nur um eine geringe Anzahl von Patienten (Müller-Wieland D, Häring HU 2001). Eine periphere Insulinresistenz kann auch bei nicht diabetischen Personen beobachtet werden, beispielsweise bei übergewichtigen Personen und Frauen im letzten Schwangerschaftsdrittel (Bernard-Kargar C, Ktorza A 2001). Bei diesen Personengruppen kommt es aber kompensatorisch zu einer Zunahme der β-Zellmasse (Kloppel G et al.1985), so dass die

sezernierte Insulinmenge den Erfordernissen entspricht und die Glucosehomeostase aufrecht erhalten bleibt. Anders ist es bei Patienten, die an Diabetes mellitus Typ II erkranken. Zunächst entwickeln auch diese Patienten eine kompensatorische Hyperinsulinämie. Die erhöhten Blutinsulinspiegel führen ihrerseits zu einer Verminderung der Insulinrezeptoren. Daraus wiederum resultiert - im Sinne eines Circulus vitiosus - eine weitere Verstärkung der Insulinresistenz der insulinsensitiven Gewebe. Im Verlauf der Erkrankung erschöpft sich die Kompensationsfähigkeit der β-Zellen. Mit fortschreitendem Krankheitsprozess nimmt nicht nur die Syntheseleistung der β-Zellen ab, sondern auch die β-Zellmasse selbst (Mandrup- Poulsen T 2001). Die β-Zellmasse der diabetischen Personen ist im Vgl. zu Personen des gleichen Körpergewichtes somit geringer ausgeprägt. Die Ursachen der im Verhältnis verringerten β-Zellmasse sind bisher nicht aufgedeckt. *Die Patienten zeigen also trotz erhöhter Blutinsulinspiegel einen relativen Insulinmangel.* Damit wird der Diabetes mellitus klinisch manifest. Diesem Stadium geht meist eine Phase der gestörten Glucosetoleranz voraus. In diesem Zeitraum ist die Störung nur postprandial in Form pathologisch erhöhter Blutglucosespiegel meßbar. Im Stadium des klinisch manifesten Diabetes mellitus Typ II trägt neben der Insulinresistenz von Leber, Muskulatur und Fettgewebe und der relativen Insulinhyposekretion noch ein weiterer Faktor zur Verschlechterung der Stoffwechsellage bei: Die endogene hepatische Glucoseproduktion kann durch Insulin nicht mehr ausreichend unterbunden werden (Kahn CR 1996).

Zu den **spezifischen Diabetestypen** mit bekannter Ursache gehören die Endokrinopathien, die durch die Produktion kontrainsulinärer Hormone zur Hyperglykämie führen können. Ebenso gehört zu dieser Gruppe der autosomal dominant vererbte Diabetes mellitus Typ II. Normalerweise erkranken an Diabetes mellitus Typ II Personen in einem höheren Lebensalter (> 40 Jahre). Da die autosomal dominante Form des Diabetes mellitus Typ II bei jungen Menschen auftritt, wird sie als „MODY“ (maturity-onset-diabetes of the young) bezeichnet. Es existieren verschiedene Untergruppen, denen je ein unterschiedlicher Gendefekt zugrunde liegt. Außer einem Gen codieren die bisher entdeckten Gene für Transkriptionsfaktoren (Malecki M, Krolewski AS 2000). Der Defekt betrifft die Insulinsekretion durch die β-Zelle, nicht die Insulinwirkung in der Peripherie (Müller-Wieland, Häring 2001). Ein nur während der Schwangerschaft auftretender Diabetes wird als Gestationsdiabetes klassifiziert. Die

betroffenen Frauen besitzen allerdings ein erhöhtes Risiko im Laufe des Lebens an Diabetes mellitus Typ II zu erkranken (Müller-Wieland, Häring 2001). Neben den beschriebenen Formen des primäre Diabetes existieren Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse, die eine Verminderung der β-Zellzahl nach sich ziehen und sekundär zur Entstehung eines Diabetes mellitus führen. Klinisch manifestiert sich ein pankreopriver sekundärer Diabetes erst, wenn 90 % der Bauchspeicheldrüse untergegangen sind. Als Ursachen für den Gewebsuntergang kommen die chronische Pankreatitis, Tumorerkrankungen, Traumata, Operationen, Entzündungen und Stoffwechselerkrankungen, wie die Akromegalie, Hämochromatose, die zystische Fibrose u.a. in Frage (Schettler, Greten 2000).

1.3. Klinisches Erscheinungsbild

Der Diabetes mellitus Typ I entwickelt sich schnell. Die meist jugendlichen Patienten erleiden einen Leistungsknick. Durch die erhöhten Blutzuckerspiegel entwickelt sich eine osmotische Diurese mit Polyurie und einer reaktiven Polydipsie. Durch die daraus resultierende Hyperosmolarität entwickelt sich eine intrazelluläre Dehydratation, die eine Bewußtseinsstörung auslöst. Ebenso tritt eine extrazelluläre Dehydratation mit Hypovolämie auf, die sich bis zum Volumenmangelschock steigern kann. Im absoluten Insulinmangel wird die Lipolyse durch das Überwiegen insulinantagonistischer Hormone aktiviert. Die in großen Mengen anfallenden Ketonkörper führen zur Entwicklung einer metabolischen Azidose. (Müller-Wieland D, Häring HU 2001; Löffler 1999).

Im Gegensatz dazu manifestiert sich der Diabetes mellitus Typ II schleichend. Die betroffenen Patienten sind meistens älter als vierzig Jahre. Die ersten Symptome sind meist unspezifisch, wie Müdigkeit und Leistungsminderung. Durch den im Initialstadium vorhandenen Hyperinsulinismus werden reaktive Hypoglykämien ausgelöst, die der Patient als Heißhungerattacken, Schwitzen, Kopfschmerzen und Schwächegefühl bemerkt. In einem späteren Stadium der Hyperglykämie kann eine Glucosurie mit osmotischer Diurese

auftreten, die sich klinisch als Polyurie mit Polydipsie äußert. Bei extrem hohen Blutglucosekonzentrationen kann sich ein hyperosmolares Koma entwickeln. Aufgrund einer vorhandenen Restinsulinsekretion findet keine Lipolyse im Fettgewebe statt und damit kommt es auch nicht zur Entwicklung einer Ketose. Die chronische Hyperglykämie führt zur Makro- und Mikroangiopathie. Als Spätschäden können sich

nach langjährig bestehendem Diabetes mellitus Typ II eine koronare Herzkrankheit und eine arterielle Verschlusskrankheit sowie zerebrale Gefäßschäden als Manifestation einer Makroangiopathie ausbilden. Die sich ebenfalls entwickelnde Mikroangiopathie führt zur diabetischen Nephropathie und diabetischen Retinopathie (Müller-Wieland, Häring 2001). Häufig entwickelt sich eine diabetische Neuropathie, die auch das autonome Nervensystem in Mitleidenschaft zieht.
Die Folgeerkrankungen sind umso schwerwiegender, je stärker die Abweichung der Blutglucosespiegel von den Normwerten war (Berger M, Pieper T, 2000; Berger M, Trautner C 2000).

1.4. Therapie

Das Therapieziel ist die Vermeidung einer hyper- oder hypoglykämischen Stoffwechselentgleisung, sowie der diabetischen Spätschäden. Der Diabetes mellitus Typ I wird durch Insulinsubstitution therapiert. Bei den zumeist adipösen Patienten mit Diabetes mellitus Typ II ist zunächst eine Gewichtsnormalisierung anzustreben (Berger M 2000). Wenn die Diät nicht erfolgreich verläuft und eine ausreichende Eigeninsulinbildung der β-Zellen vorhanden ist, wird eine Monotherapie mit einem oralen Antidiabetikum eingeleitet. Darunter fallen die α-Glucosidasehemmer (Acarbose, Miglitol). Sie führen zu einer kompetitiven, reversiblen Hemmung der α-Glucosidase der Dünndarmmukosa. Die dadurch verzögerte Kohlenhydratresorption verhindert das Auftreten postprandialer Blutglucosespitzen (Berger M 2000). Das Biguanid Metformin reduziert die intestinale Glucoseresorption, hemmt die Gluconeogenese der Leber und steigert die Glucoseaufnahme aus dem Blut ins Zielgewebe. Durch Metformin werden keine Hypoglykämien ausgelöst (Klepser TB, Kelly MW 1997). Häufige Anwendung in der Diabetestherapie finden die Sulfonylharnstoffe (z.B.Glibenclamid, Glimepirid). Sie verursachen eine Steigerung der Insulinsekretion unabhängig von der Höhe des Blutglucosespiegels bei vorhandener endogener Insulinsekretion und führen zu einer Steigerung der Empfindsamkeit der β-Zellen auf Glucose (a Aguilar-Bryan L et al. 1995; Philipson LH, Steiner DF 1995). Sulfonylharnstoffe bewirken diesen Effekt über Bindung an ihre spezifische Rezeptoren in der Plasmamembran der β-Zellen. Diese Ligandenbindung führt zum Schließen der ATP-abhängigen Kaliumkanäle. Die daraus resultierende Membrandepolarisation führt über Zwischenschritte zur Exocytose von Insulin (Ashcroft FM, Rorsman P 1989; b Aguilar-Bryan L et al. 1998). Nachteile dieser Therapie sind eine Verstärkung der

ohnehin bestehenden Hyperinsulinämie und das Auftreten u.U. lebensbedrohlicher Hypoglykämien (Krentz et al. 1994).
Thiazolidine – die „Insulinsensitizer"- erhöhen die Insulinsensitivität im Zielgewebe, v.a. in Muskelzellen und verbessern die Funktion der β-Zellen. Für die Entfaltung ihrer Wirkung benötigen sie das Vorhandensein endogenen Insulins. Thiazolidine sind Agonisten des Transkriptionsfaktors PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) und bewirken eine verstärkte Expression insulin-sensitiver Gene (Nattrass M, Bailey CJ 1999; Müller-Wieland, Häring 2001; Schopjans C, Auwerx J 2000; Parulkar AA et al. 2001). Zur Zeit sind Thiazolidine nur in Kombination mit Metformin oder Sulfonylharnstoffen zugelassen.
Kann unter Diät und einer Monotherapie keine zufriedenstellende Einstellung des Blutglucosespiegels erreicht werden, können die verschiedenen Substanzgruppen auch untereinander kombiniert werden. Kommt es zu einer gänzlichen Erschöpfung der β-Zellen, kann nur noch mit Insulin therapiert werden (Berger M 2000).

2. Tiermodelle des Diabetes mellitus Typ II

Die Insulinresistenz der insulinsensitiven Gewebe Leber, Fett und Muskulatur wurde als Hauptfaktor angesehen, der zur Entstehung des Diabetes mellitus Typ II führt. Erhärtet wurde diese Sichtweise durch die zunächst vorhandene Hyperinsulinämie in Patienten mit Diabetes mellitus Typ II, die als Indiz für funktionsfähige und intakte ? -Zellen gewertet wurde. Aus diesem Grund wurde die Insulinresistenz der insulinabhängigen Gewebe in den 80iger und 90iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts zum Leitmotiv der Erforschung des Diabetes mellitus Typ II (Cerasi E et al. 2001). Durch Untersuchungsergebnisse an transgenen Mäusen hat sich diese Sichtweise in den letzten Jahren verändert: Zur Entstehung des Diabetes mellitus Typ II tragen eine Insulinresistenz und ein β-Zelldefekt bei. Eine alleinige Störung nur einer der beiden Faktoren, die zum Diabetes mellitus Typ II führt, ist sehr selten (Cerasi E et al. 2001).

Die Mausmodelle erlauben einen Einblick in die gewebsspezifische Insulinwirkung. Möglich wird dies anhand der sogenannten CreloxP Methode, durch welche eine gewebespezifische Genausschaltung gelingt. Die zell- und/oder gewebsspezifische Ausschaltung von Komponenten der Insulinrezeptorsignaltransduktion kann dadurch Antwort auf die Frage geben, welche Bedeutung der Insulinsignaltransduktion in den

einzelnen Geweben zukommt oder anders formuliert, welchen Stellenwert sie in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ II einnimmt (Müller-Wieland, Häring 2001). Mäuse mit einer doppelten Nullmutation der Insulingene Ins1 und Ins2 (Ins 1-/- und Ins 2-/- Mäuse) entwickeln einen schweren Diabetes mellitus und versterben am zweiten Lebenstag (Duvillie B et al. 1997). Auch durch die komplette Ausschaltung des Insulinrezeptorgens versterben die Mäuse nach einer Lebenszeit von etwa einer Woche an einem stark ausgeprägten Diabetes mellitus Typ II mit Hyperglykämie und Hyperinsulinämie (Joshi RL et al. 1996). Transgene Mäuse deren Insulinrezeptorgen spezifisch in der Skelettmuskulatur ausgeschaltet worden ist, entwickeln überraschenderweise keinen diabetischen Phänotyp, auch die Blutglucose liegt im Normbereich. Sie haben aber als Folge der peripheren Insulinresistenz erhöhte Insulin- und Triglyzeridspiegel im Blut (a Brüning JC et al. 1998). Wird das Insulinrezeptorgen spezifisch in β-Zellen ausgeschaltet, so prägen diese Mäuse eine Insulinsekretionsstörung aus, wie sie auch bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II auftritt; und zwar betrifft die Störung die glucoseinduzierte Insulinsekretion bei intakter argininstimulierter Insulinsekretion. Klinisch zeigen die Mäuse die Zeichen einer gestörten Glucosetoleranz, entsprechend eines präklinischen Stadiums des Diabetes mellitus Typ II (Kulkarni RN et al. 1999). Wird das Insulinrezeptorgen im zentralen Nervensystem ausgeschaltet, so leiden diese Mäuse an einer Hyperphagie die zur Entwicklung einer Adipositas beiträgt, deren Folgen wiederum eine Insulinresistenz und erhöhte Triglyzeridspiegel im Blut sind (b Brüning JC et al. 2000).

Dem Insulinrezeptor sind die IRS (**I**nsulin **R**ezeptor **S**ubstrat) Isoformen in der Signaltransduktionskaskade nachgeschaltet. IRS1 ist das Hauptsubstrat des Insulinrezeptors.

IRS1 defiziente Mäuse zeigen ein retardiertes embryonales und postnatales Wachstum. Sie bilden eine Insulinresistenz in Muskulatur und Fettgewebe aus. Durch die sich ausbildende Hyperinsulinämie bleibt der Blutglucosespiegel im Normbereich. Der gesteigerte Insulinbedarf wird durch eine 50%ige Zunahme der β-Zellmasse dieser Tiere gedeckt (Burks DJ, White MF 2001). Damit gleicht der Phänotyp der IRS1 -/- Mäuse einem Diabetes mellitus Typ II im prädiabetischen Stadium der Insulinresistenz. Neben der Insulinresistenz bilden diese Mäuse dem metabolischen Syndrom entsprechend einen Hypertonus und eine Hypertriglyceridämie aus (Abe H et al. 1998). Die Insulinwirkung in der Leber ist bei den IRS1-/- Mäusen weitgehend erhalten, da das IRS1 Defizit in der Leber durch eine erhöhte Menge an IRS2 ausgeglichen wird.

Dieser Kompensationsmechanismus findet in Muskulatur und Fettgewebe nicht statt (Yamauchi T et al. 1996). Mäuse mit einer Ausschaltung des IRS2 Gens erkranken im Alter von zehn Wochen an einem Diabetes mellitus Typ II. In den IRS2-/- Mäusen liegt eine Insulinresistenz vor, deren Ursache ein gestörter Insulinsignalweg in der Leber ist, wohingegen der Insulinsignalweg der Skelettmuskulatur intakt bleibt. Neben der Insulinresistenz entwickeln die Mäuse eine Inselzellhypoplasie. Die ? -Zellmasse ist im Vgl. zum Wildtyp auf 83 % reduziert. Allerdings ist die Insulinsekretion der einzelnen ? -Zelle in IRS2-/- Mäusen wahrscheinlich erhöht (Withers DJ et al. 1998; Kubota N et al. 2000).

Nullmutationsmäuse der Glucokinase sterben bereits nach einer Woche. Sie bilden einen Diabetes mellitus aus und zeigen die Zeichen einer Leberverfettung. Fehlt die Glucokinase nur in der Leber und ist in den β-Zellen vorhanden, so sind die transgenen Mäuse überlebensfähig (Grupe A et al.1995; Terauchi Y et al. 1995).

Mäuse denen die p70 S6 Kinase 1 fehlt, zeigen eine selektive Abnahme der β-Zellgröße, die zur Entwicklung einer Hypoinsulinämie und einer dadurch bedingten Glucoseintoleranz führt. In den insulinsensitiven Geweben kann keine Insulinresistenz nachgewiesen werden. Der Phänotyp der Mäuse ähnelt dem eines Diabetes mellitus Typ II im präklinischen Stadium (Pende M et al. 2000).

Anhand dieser Tiermodelle wird deutlich, dass ein genetischer Defekt eines Signalmoduls des Insulinsignalweges eine Veranlagung für Diabetes mellitus Typ II darstellen kann. Der Diabetes mellitus wird manifest, wenn neben der gestörten peripheren Insulinwirkung zusätzlich eine gestörten Insulinsekretion der β-Zelle vorliegt.

3. Wachstumsfaktoren für b-Zellen

Durch Übergewicht und Insulinresistenz entsteht im Organismus ein erhöhter Insulinbedarf. Physiologischerweise entwickelt sich durch die hormonelle Umstellung während einer Schwangerschaft ebenfalls eine Steigerung des Insulinbedarfs. Die β-Zellen des Pankreas sind in der Lage auf Änderungen des Glucoseangebotes zu reagieren, sich durch dynamische Änderungen ihrer Zellmasse an den Insulinbedarf des Organismus anzupassen und Glucosehomeostase zu erhalten. So konnte an Mensch und Tier gezeigt werden, dass die β-Zellmasse linear mit dem Körpergewicht korreliert (Nielsen JH et al. 1999; a Bonner-Weir S 2000). Die Zellmassenänderung kann auf der

einen Seite durch eine Zunahme der β-Zellzahl oder des Zellvolumens und auf der anderen Seite durch Änderungen der Apoptoserate erreicht werden. Beide Prozesse bestehen nebeneinander. Die Massenänderungen der β-Zellen werden durch proliferative Signale vermittelt. Diese Faktoren stehen in einem exakt abgestimmten Wechselspiel mit Faktoren, die β-Zellwachstum inhibieren. Manche Faktoren wirken abhängig von der Stoffwechselsituation und ihrer Blutkonzentration, sowohl wachstumsstimulierend als auch inhibierend.

Glucose ist ein Wachstumsfaktor für pankreatische β-Zellen (Hellerstrom C und Swenne I 1991). Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass viertägige Glucoseinfusionen zu einer Zunahme der β-Zellmasse um etwa 80% führten, wobei der Blutglucosespiegel im Normbereich gehalten wurde. In einer weiteren Versuchsreihe wurden statt Glucoseinfusionen Lipidinfusionen verabreicht. Die Wirkung der freien Fettsäuren war mit Glucose vergleichbar: Auch hier kam es zu einer Zunahme der β-Zellproliferation (Steil GM et al. 2001). In hohen Konzentrationen allerdings inhibieren sowohl freie Fettsäuren als auch Glucose die β-Zellproliferation (a Nielsen JH et al. 2001). Glucoseabhängig wirken wiederum eine Vielzahl anderer Faktoren proliferationsfördernd auf β-Zellen. Zu diesen gehören „Growth hormone“ (GH) (a Cousin et al. 1999) und „insulin like growth factor-1“ (IGF-1) (Hügl SR et al. 1998 / Cousin et al. 1999). Die während der Schwangerschaft erhöhten Blutspiegel von Prolactin (PRL) und „placental lactogen“ (PL) wirken wachstumsfördernd auf β-Zellen (Parsons JA et al. 1992 und 1995; b Nielsen JH et al. 1999). Neben den beispielhaft angeführten Wachstumshormonen und Metaboliten existieren weitere Substanzen, die β-Zellproliferation modulieren. Von besonderem Interesse sind Hinweise, dass auch Insulin im Sinne einer autokrinen Stimulation (Kulkarni RN et al. 1999) und das Inkretinhormon GLP-1 -„Glucagon-like Peptide-1“ - (Stoffers DA 2000, a Buteau et al. 1999) proliferative Wirkung auf β -Zellen ausüben können.

4. Glucagon-like Peptide-1 (Glucagon-ähnliches Peptid-1)

Bereits 1906 wurde von Moore et al. eine Wechselwirkung zwischen Pankreas und Darm postuliert. Für diese intestinalen Substanzen, die Einfluß auf die Funktion der Bauchspeicheldrüse nehmen, wurde die Bezeichnung *Inkretine* geprägt (Zunz E und La Barre J 1929). 1935 gelang es in Extrakten aus Dünndarmschleimhaut von Rind und

Kaninchen Faktoren mit dieser Eigenschaft nachzuweisen (Heller H 1935). Mc Intyre et al. und Elrick et al. (1964) erbrachten den Beweis für die Verbindung zwischen Intestinum und endokrinem Pankreas durch folgendes Experiment: Nach oraler Glucoseapplikation wurde eine höhere Insulinsekretion als nach intravenöser Gabe äquimolarer Glucosemengen erreicht. Diese Verbindung von intestinalen Hormonen und der Bauchspeicheldrüse wird als *enteroinsuläre Achse* bezeichnet (Unger RH und Eisentraut AM 1969).

Creutzfeld entwickelte 1979 das bis heute gültige *Inkretinkonzept.*
Inkretinhormone müssen drei Eigenschaften besitzen:

1. Sie werden von endokrinen Zellen des Darmes synthetisiert.
2. Sie werden nach Nahrungsaufnahme sezerniert.
3. Sie führen glucoseabhängig zu einer Insulinfreisetzung.

Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) erfüllt die von Creutzfeld formulierten Kriterien. GLP-1 gilt als das wirksamste Inkretinhormon.

Das „Glucagon-ähnliche Peptid-1“ (GLP-1) ist ein Peptidhormon, welches zur Superfamilie der Glucagon verwandten Peptide gehört. Es entsteht ebenso wie Glucagon aus dem Vorläufermolekül Präproglucagon. Das Proglucagon-Gen befindet sich auf dem Chromosom 2q. Das Gen besitzt 6 Exons und 5 Introns (Bell et al. 1983). Das Proglucagongen enthält die Basensequenzen, die für das sog. „glicentin-spezifische Peptid“, Glucagon, GLP-1 und GLP-2 codieren. Es wird in drei Gewebearten exprimiert und zwar in den pankreatischen α-Zellen, den intestinalen L-Zellen und in neuronalen Zellen (a Kieffer TJ und Habener F 1999).
Aus dem Vorläufermolekül Präproglukagon entstehen gewebespezifisch durch alternative posttranslationale Prozessierung die unterschiedlichen Hormone (a Mojsov S et al. 1986).
In pankreatischen α-Zellen führt die zellspezifische Prozessierung von Präproglucagon hauptsächlich zur Produktion von Glucagon. In geringer Menge ist allerdings auch GLP-1 detektierbar (Heller RS 1995; Shima K 1987; b Mojsov S 1990). Auch in Zellen des zentralen Nervensystems konnte GLP-1 nachgewiesen werden (a Kreymann B et al. 1989; Larsen PJ et al. 1997; Yoshimoto S et al. 1989). Der Hauptsyntheseort von GLP-1 sind jedoch die L-Zellen, welche im menschlichen Darm in großer Anzahl im distalen Jejunum und Ileum vorhanden sind. Im Colon finden sie sich in kontinuierlich

steigender Zahl mit der höchsten Zelldichte im Rektum (Eissele R et al. 1992; Bryant MG et al. 1983; Moody AI 1980; Sjolund D et al. 1983). Aus dem Präproglucagon werden zuerst GLP-1(1-37) und GLP-1(1-36amid) prozessiert, die nicht bioaktiv sind. Ihre Funktion ist unbekannt (a Kieffer TJ und Habener F 1999). Erst nach der Abspaltung von 6 N-terminalen Aminosäuren entstehen die biologisch aktiven Peptide [GLP-1(7-37)] und die am C-Terminus amidierte Form [GLP-1(7-36)amid] (a Mojsov et al. 1986). GLP-1 wird glucoseabhängig sezerniert und stimuliert an der β-Zelle die Insulinsekretion. Zudem ist es ebenfalls in der Lage, die Insulinsynthese zu steigern (a Holst JJ et al. 1987; b Kreymann et al. 1987; a Fehmann et al. 1995). Der exakte Mechanismus der GLP-1 Sekretion ist nicht bekannt. Neben hormonellen und neuronalen Reizen wird auch der direkte Kontakt mit Nahrungsbestandteilen, wie Fetten, Kohlenhydraten und Peptiden als Sekretionsreiz für GLP-1 angesehen. Nach oraler Glucoseaufnahme erfolgt bereits eine GLP-1 Freisetzung in die Blutbahn, bevor Glucose die L-Zellen enthaltenden Darmabschnitte erreicht (Herrmann C et al. 1995; Nauck MA et al. 1993; Elliott RM et al. 1993). Möglicherweise existieren in weiter proximal gelegenen Darmabschnitten Botenstoffe, die zu einer Freisetzung von GLP-1 führen (Schirra et al. 1996). In Experimenten konnte eine GLP-1 Freisetzung durch „glucose-dependent insulinotropic peptide“ -GIP - (Roberge JN et al. 1993), welches selbst ein Inkretinhormon ist; und ebenso durch das Neuropeptid „calcitonin gene-related peptide“ (CGRP) (Hermann Rinke C et al. 2000) induziert werden.

Die GLP-1 Wirkungen sind vielfältig. Neben der beschriebenen glucoseabhängigen Insulinsekretion wird auch die Somatostatinsekretion induziert und die Glucagonfreisetzung inhibiert. Extrapankreatisch verringert GLP-1 die Wasser- und Nahrungsaufnahme über Steuerung des Sättigungszentrums im Hypothalamus. Magenmotilität und die gastrale Säuresekretion werden gehemmt. Möglicherweise kann GLP-1 insulinähnliche Effekte auf Fettgewebe, Muskulatur und Leber ausüben (a Kieffer TJ und Habener F 1999).

5. Insulin und Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1)

Insulin ist das Schlüsselhormon der Blutglucosehomeostase. In der Leber stimuliert Insulin die Glykogenese und inhibiert Gluconeogenese und Glykogenolyse. In den insulinsensitiven Geweben Fett und Muskulatur fördert Insulin die Glucoseaufnahme, die Glucosemetabolisierung und die Glykogensynthese. Insulin steuert neben dem

Glucosemetabolismus, den Protein- und Lipidmetabolismus (Felig P et al. 1990) und die Genexpression von über 150 Genen. Zur Zeit sind acht unterschiedliche Gensequenzen („insulin response sequences“) definiert, durch welche Insulin die Gentranskription reguliert (O'brien RM et al. 2001). Auf die β-Zelle selbst übt Insulin eine autokrine Stimulation aus. Dies führt über eine gesteigerte Insulingentranskription zum Anstieg der Insulinbiosynthese. (Die beschrittenen Signalwege sind der Insulinrezeptor/IRS-2/PI3K/p70 s6k Weg und der CaM kinase Signalweg (Leibinger IB et al. 1998)). Die Insulinsekretion wird über den Blutglucosespiegel reguliert. Eine Erhöhung der Blutglucosekonzentration führt über die Glucosetransporter Isoform GLUT 2 zu einer vermehrten Glucoseaufnahme in die β-Zelle. Daraufhin wird das Glucosemolekül durch die Glucokinase phosphoryliert und die Glycolyse kann stattfinden. Durch die Glycolyse entsteht ATP. Die Veränderung des ATP/ADP Verhältnisses führt zum Schließen ATP abhängiger Kaliumkanäle. Die Plasmamembran wird depolarisiert, spannungsabhängige Calciumkanäle öffnen sich und die intrazelluläre Konzentration des freien Calciums steigt an. Der intrazelluläre Calciumanstieg bewirkt die Exocytose der Insulingranula (Leibinger IB et al. 1998). Das Insulinmolekül besteht aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Peptidketten mit 21 und 30 Aminosäuren. Es wird aus dem Vorläuferprotein Präproinsulin durch Herausschneiden des C-Peptides (connecting peptide) synthetisiert.

Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1), auch als Somatomedin C bezeichnet, gehört in die Klasse der Wachstumsfaktoren und ist an der Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und –transformation beteiligt (Benito M et al. 1996). Der Hauptsyntheseort von IGF-1 ist die Leber. Die IGF-1 Synthese wird durch das Wachstumshormon / „Growth hormon“ (GH) stimuliert. IGF-1 ist ein einkettiges Polypeptid mit 67 Aminosäuren, welches in 50% homolog zu Proinsulin ist. Der Insulinrezeptor und der IGF-1 Rezeptor zeigen eine große strukturelle Übereinstimmung. Der IGF-1 Rezeptor ist in der Lage Insulin zu binden und dadurch einige Insulineffekte, wie Glucoseaufnahme in die Zelle und deren Einbau in Glykogen, zu vermitteln (Lamothe B et al. 1998). In den meisten Zellverbänden wird durch IGF-1 und Insulin ein ähnlicher Signalweg über Aktivierung des IRS Isoformen /PI3K Weges und über die Aktivierung des ras/raf/MAP Kinase Signalweges beschritten (Kadowaki T et al. 1996; Lopaczynski W 1999).

6. Signaltransduktionswege der b-Zelle

Die drei Peptidhormone Insulin, IGF-1 und GLP-1 sind aufgrund ihrer Hydrophilie nicht in der Lage in das Zellinnere ihrer Zielzelle einzudringen. Ihre Hormonwirkung vermitteln sie über ihre extrazellulären Rezeptoren. Durch die Ligand-Rezeptorbindung werden Signalübertragungswege angestoßen, die am Ende eine zelluläre Antwort hervorrufen.

6.1. Signalübertragung am GLP-1 Rezeptor

Der GLP-1 Rezeptor ist ein 7-Transmembrandomänen Rezeptor (Thorens et al. 1993; Dillon et al. 1993), welcher der Familie der GTP-bindenden-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) zugeordnet wird. Die heterotrimeren G-Proteine setzen sich aus den Untereinheiten α, β und γ zusammen. Sie bilden die Verknüpfung zwischen den Rezeptoren und ihren intrazellulären Effektoren. Die Gα-Proteine werden in stimulierende G-Proteine (Gα_s) und inhibierende G-Proteine (Gα_i) unterteilt. Gα_s-Proteine aktivieren die Adenylatcyclase (AC) und Gα_i-Proteine hemmen diese. Mit dem GLP-1 Rezeptor ist ein stimulierendes Gα_s-Protein assoziiert. Im Ruhezustand liegt das Gα_s-Protein als Heterotrimer vor, wobei an die α_s-Untereinheit GDP gebunden ist. Wird der GLP-1 Rezeptor durch Ligandenbindung aktiviert, vollzieht er einen Konformationswechsel, der ihn dazu befähigt inaktives membrangebundenes G-Protein zu binden. Nach der Ligand- Rezeptorbindung wird die Affinität von α_s für GDP erniedrigt, so dass GDP von α_s dissoziiert und GTP an seine Stelle tritt. Durch die Bindung von GTP liegt das G-Protein in der aktivierten Form vor. Das aktivierte G-Protein dissoziiert in die α- Untereinheit (Gα?GTP) und in die β/γ-Untereinheit. Die α_s-Untereinheit bindet an ein Adenylatcyclase (AC)-Molekül und stimuliert dieses. Die Bindung von α_s an die AC stimuliert außerdem die intrinsische GTPase - Aktivität der α- Untereinheit, so dass GTP in GDP und ein freies Phosphat hydrolysiert wird. Dadurch wird die α–Untereinheit inaktiviert und die drei Untereinheiten des G-Proteins schließen sich wieder zusammen. Die AC ist ein Enzym, welches im aktiven Zustand die Bildung des sekundären Botenstoffes c-AMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) aus ATP katalysiert.

Steigt der cytoplasmatische c-AMP Spiegel an, wird die „cAMP dependent kinase“ A (PKA) aktiviert, die aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten

besteht. Durch die Stimulation kommt es zur Dissoziation des Komplexes und die nun freie katalytische Untereinheit wird als Serinkinase cytoplasmatisch und nukleär aktiv. Eines ihrer nukleären Zielproteine ist der Transkriptionsfaktor „CRE bindendes Protein“ (CREB), welcher an die DNA-Sequenz „ cAMP-responsive element“ (CRE) bindet. Phosphoryliert die PKA einen spezifischen Serinrest (Ser 133) von CREB, resultiert daraus eine Steigerung der Transkriptionsrate der nachgeschalteten DNA- Sequenz, allerdings ohne das CREB seine DNA-Bindungsaffinität verändert (Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1995; Cass LA et al. 1999; Richards JS 2001). Der Promoter des Insulingens enthält eine CRE Sequenz. GLP-1 ist dadurch in der Lage nach Rezeptorbindung über den cAMP/PKA-Signalweg die Transkription des Proinsulingens zu induzieren (b Fehmann et al. 1992). Durch den Anstieg des c-AMP Spiegels kommt es weiterhin zu einer Erhöhung des intrazellulären freien Calciums. Die erhöhte Kalziumkonzentration vermittelt die glucoseabhängige Insulinsekretion der β–Zellen. Die Proteinkinase A ist an diesem Mechanismus wahrscheinlich nicht direkt beteiligt, da spezifische PKA-Inhibitoren den nach GLP-1 Stimulation erreichten Calciumanstieg nicht blockieren können (Bode HP 1999).

6.2. Signalübertragung am Insulin- und IGF-1 Rezeptor

6.2.1. Der Insulinrezeptor und der IGF-1 Rezeptor

Der Insulinrezeptor ist ein tetrameres Transmembranprotein mit jeweils zwei homologen α-Untereinheiten (135kDalton) und β-Untereinheiten (95kDalton). Die Untereinheiten sind über Disulfidbrücken verbunden. Gemeinsam werden sie durch ein einziges Gen codiert, welches sich auf dem kurzen Arm des Chromosom 19 befindet (Kahn et al. 1995). Die Aufgabe der extrazellulären α–Untereinheiten ist die Insulinbindung, die β-Untereinheiten besitzen intrinsische Tyrosinkinaseaktivität und vermitteln die Signalweiterleitung, indem sie Phosphatgruppen von ATP auf Tyrosinreste ihrer Zielproteine übertragen. Der IGF-1 Rezeptor gehört – wie der Insulinrezeptor - zu der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Er besteht ebenfalls aus der extrazellulären α-Untereinheit und der intrazellulären β-Untereinheit. Aufgrund der großen Strukturähnlichkeit zwischen dem Insulinrezeptor und dem IGF-1 Rezeptor kann es zur Hybridbildung zwischen Untereinheiten dieser Rezeptoren kommen (Frattali AL et al. 1992).

Nachdem Insulin an die α?Untereinheit des Insulinrezeptors gebunden hat, kommt es durch eine Konformationsänderung des Rezeptors zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase, welche Tyrosinreste der β-Untereinheit autophosphoryliert (Kahn et al 1996). An die Phosphotyrosinreste der β- Untereinheit können Proteine mit „phosphotyrosine binding“ (PTB) - Domänen oder Src - homology 2 (SH2)-Domänen binden (Virkamäki et al. 1999).

6.2.2. Insulinrezeptor-Substrat (IRS) Isoformen

Die IRS Isoformen sind Adapterproteine, die eine Verbindung zwischen der β-Untereinheit des Insulinrezeptors und Signalproteinen herstellen, die eine SH2 Domäne besitzen. Adapterproteine besitzen selbst keine enzymatische Aktivität. Die IRS-Isoformen besitzen neben der PTB-Domäne eine Pleckstrin – homology (PH) -Domäne, welche in der Lage ist, das Protein an die Zellmembran zu binden. Bisher sind neun Isoformen der IRS Proteine identifiziert worden. Am Bedeutungsvollsten für die Insulinsignaltransduktion gelten die Isoformen IRS1 bis IRS4 (Virkamäki et al. 1999). Ebenso konnten in Gab-1 (besitzt keine PTB-Domäne) durch den Insulinrezeptor phosphorylierte Tyrosinreste nachgewiesen werden (Müller-Wieland et al. 2000). Weitere Isoformen sind Shc (besitzt keine PH-Domäne) mit drei Isoformen und p 62 dok. Haben die IRS Proteine durch die PTB Domänen an die β-Untereinheit des aktivierten Insulinrezeptors gebunden, werden sie tyrosin- und serin-phosphoryliert. Die phosphorylierten Tyrosinreste der IRS-Isoformen sind in ein spezifisches Aminosäuresequenzmuster (YMXM) eingebettet, welches von SH2 domänehaltigen Adapterproteinen erkannt wird (Virkamäki et al. 1999).

6.2.3. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)

Die regulatorische Untereinheit der PI3K besitzt SH2 Domänen und kann sowohl direkt an die β-Untereinheit des Insulinrezeptors als auch an IRS Proteine binden. Sie übernimmt die Funktion eines Adapterproteins. Die PI3K ist eine Lipidkinase, welche die Hydroxylgruppe an Position 3 des Inositolringes der Membranphosphatidylinositole phosphoryliert. Es entstehen PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P_2 und PtdIns(3,4,5)P_3. PtdIns(3)P ist in allen eukaryontischen Zellen konstitutiv vorhanden. Die Konzentrationen an PtdIns(3,4)P_2 und PtdIns(3,4,5)P_3 steigen erst nach Stimulation der Zelle durch unterschiedliche Liganden an. Die PI3K ist ein Heterodimer, bestehend aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit. Es sind acht Isoformen der

regulatorischen Untereinheit bekannt: jeweils zwei Formen von p85α, p55α und p50α, sowie p85β und $p55^{PIK}$.

Nach den Eigenschaften der katalytischen Untereinheiten unterteilt man die PI3K in drei Klassen. Die Klasse I wird noch einmal in die Subklassen A und B unterteilt. Ihr Hauptsubstrat sind PtdIns(3,4)P2. Zur Subklasse IA gehören p110α, p110β und p110δ. Sie interagieren mit Adapterproteinen, die eine SH2-Domäne besitzen und an Phosphotyrosinreste binden. Dadurch wird die katalytische PI3K Untereinheit in den Signalweg der Tyrosinkinaserezeptoren eingebunden, d.h. der Subtyp IA der PI3K ist in die Insulinrezeptorsignalweiterleitung involviert. Zu dem Subtyp IB gehört die katalytische Untereinheit p110y. Sie interagiert nicht mit Adapterproteinen, die eine SH2-Domäne aufweisen, sondern wird durch die β/γ Untereinheit von G-Proteinen stimuliert. Die PI3K der Klasse II generieren PtdIns(3)P und PtdIns(3,4)P_2. Es handelt sich bei dieser Klasse um Moleküle von einem Molekulargewicht über 200 kDa. Die Klasse III schließlich produziert nur PtdIns. Sie spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Produktion von Membranvesikeln und „membranetrafficing“ (Fruman DA et al. 1998, Leevers SJ et al. 1999).

6.2.4. Proteinkinase B (PKB)

Ein Substrat der PI3K ist die Proteinkinase B. Die PI3K stimuliert die PKB/Akt entweder über eine direkte Bindung von 3D-phosphorylierten Phosphoinositiden an die PH Domäne der PKB/Akt selbst oder über die zwischengeschalteten PKB/Akt Kinasen „PtdIns(3,4,5)P_3–dependent kinase 1“ (PDK-1) und „PtdIns(3,4,5)P_3-dependent kinase 2“ (PDK-2)(Murga C et al. 1998, Coffer PJ et al. 1998, Leevers SJ et al. 1999). In vielzelligen Organismen muß Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose streng reguliert werden, um einen funktionsfähigen Gesamtorganismus aufrechtzuerhalten. Diese Aufgabe wird von Wachstumsfaktoren übernommen, die nach Rezeptorbindung an der Zelloberfläche spezifische Signalkaskaden auslösen. Die Serin/Threoninkinase PKB/c-Akt mit einem Molekulargewicht von 57 kDa ist für eine Vielzahl von Zellen Schlüsselenzym für Zellproliferation und Antiapoptose (Coffer PJ et al. 1998, Datta et al. 1997, Dudek et al. 1997). Die folgende Abbildung zeigt die schematische Repräsentation der PKB/Akt Struktur (Coffer PJ et al. 1998).

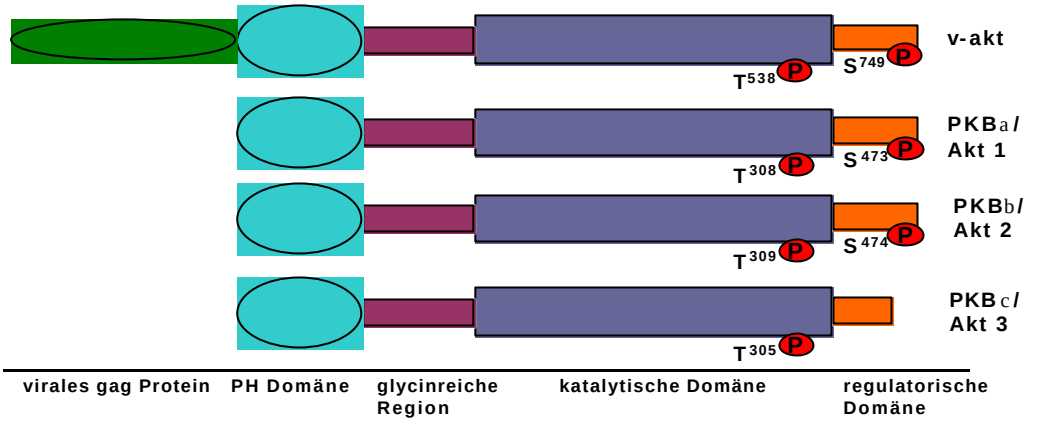

Abb. 1. Schematische Repräsentation der PKB/Akt Struktur (Coffer et al. 1998). Die Struktur der PKB zeigt Ähnlichkeiten zu den Kinasen PKA und PKC. Sie stellt das zelluläre Homologon eines Retrovirus dar, der aus Tumorgewebe isoliert werden konnte und die Bezeichnung Akt8 erhielt. Die oberste Zeichnung zeigt dieses virale Onkogen v-Akt, darunter sind die natürlicherweise vorkommenden Isoformen der PKB/Akt angeordnet. Die virale Form besteht aus einer Fusion der zellulären PKB und dem viralen GAG-Protein, welches zu einer festen Anbindung an die Plasmamembran führt. Normalerweise ist die PKB zu 90% im Cytoplasma lokalisiert. Der N-Terminus enthält eine PH-Domäne und eine glycinreiche Region. Die Kinaseaktivität wird über Dephosphorylierung und Phosphorylierung spezifischer Serin/Threoninreste geregelt, die im Bereich des C-terminalen Endes angeordnet sind.

Eine Phosphorylierung dieser spezifischen Aminosäurereste führt zu einer Aufhebung der intermolekularen Hemmung und zur Aktivität der Kinase. PKB/Akt Isoformen werden ubiquitär exprimiert. Die höchsten Spiegel an PKB/Akt α und β?finden sich im Gehirn, Thymus, Herz und Lunge. Die PKB/Akt Isoform γ ist insgesamt selektiver exprimiert (Coffer PJ et al. 1998). Alle PKB/Akt Isoformen sind in pankreatischen β-Zellen vorhanden und werden durch IGF-1 stimuliert (Holst LS et al. 1998).

Im aktivierten Zustand reguliert die PKB/Akt den Glucosehaushalt und die Proteinsynthese der Zelle. Über die Aktivierung der *p70 ribosomalen S6 Kinase (p70S6K)* kommt es zur gesteigerten Translation spezifischer m-RNAs. Die PKB/Akt phosphoryliert Serinreste der *Transkriptionsfaktoren „forkhead in rhabdomyosarkoma“ (FKHRL1) und AFX* (Brownawell AM et al. 2001; Brunet A et al. 1999) aus der „forkhead“ Familie und inhibiert dadurch einen apoptotischen Signalweg. Über die Phosphorylierung und Inaktivierung von BAD und Caspase 9 werden weitere Apoptosesignalwege inhibiert. Die durch PKB/Akt erfolgende Phosphorylierung der 6-*Phosphofructose-2- kinase (PFK2)* führt zur Glykolyse, während die Hemmung der „Glycogen Synthase Kinase 3β" *(GSK-3β)*? zu einer gesteigerten Glykogensynthese

führt. Die PKB vermittelt die Translokation von Glucosetransportern GLUT 4 an die Zelloberfläche und ist dadurch an der Regulation der Glucoseaufnahme in die Zelle beteiligt (Coffer PJ et al. 1998).

Die beiden beschriebenen Signalübertragungswege – über G-Protein-Rezeptoren auf der einen Seite und Tyrosinkinaserezeptoren auf der anderen Seite - stehen nicht isoliert nebeneinander, sondern sind in ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden eingebettet.
Die einzelnen Pfade sind miteinander vernetzt, dadurch beeinflussen sie sich hinsichtlich ihrer Aktivität gegenseitig („crosstalk“). Die Weiterleitung eines ankommenden Signals zum Zellkern kann deshalb auf unterschiedliche Weise modifiziert werden.

7. Ziel der Arbeit

Durch die zur Zeit existierenden Therapiemöglichkeiten des Diabetes mellitus Typ II werden vor allem die periphere Insulinresistenz behandelt und die Syntheseleistung der β-Zellen gefördert. Patienten mit Diabetes mellitus Typ II zeigen im Vgl. zu gesunden Probanden eine relative Verringerung der β-Zellmasse (b Nielsen JH et al. 1999), für die es zum jetzigen Zeitpunkt allerdings keine Behandlungsmöglichkeit gibt. Bestände die Möglichkeit einer Abnahme der β-Zellmasse entgegenzuwirken und die β-Zellproliferation durch Gabe von Wachstumsfaktoren zu fördern, könnte auf diese Weise ein Faktor beseitigt werden, der zur Ausbildung des Diabetes mellitus Typ II beiträgt. Kenntnisse über mitogene und anti-apoptotische Signalübertragungswege in β-Zellen könnten den Weg für neue therapeutische Interventionen bei Diabetes mellitus Typ II bereiten.

Glucose und IGF-1 wurden als Wachstumsfaktoren für pankreatische β-Zellen charakterisiert. Es gibt auch Hinweise auf eine proliferative Wirkung von Insulin und GLP-1 auf β-Zellen. Daher wurde zunächst untersucht, ob Insulin und GLP-1 im Vergleich zu IGF-1 als Wachstums- und anti-apoptotische Faktoren auf β-Zellen wirken.

Die Proteinkinase B/Akt ist ein wichtiges Modul für die mitogene Signaltransduktion. IGF-1 aktiviert die PKB/Akt in PI3K abhängiger Weise. Es wurde untersucht, ob die PKB/Akt durch Insulin und GLP-1 aktiviert wird und wie im Vergleich zu IGF-1 die spezifischen PKB/Akt Aktivierungsmuster von GLP-1 und Insulin aussehen. Für die Versuche wurde als Modell für insulinproduzierende β-Zellen die gut charakterisierte β-Zell-Linie INS-1 verwendet. Bei INS-1 Zellen handelt es sich um eine Insulinoma-Zell-Linie aus der Ratte (Asfari et al. 1992).

B Material und Methoden

1. Material

Hepes, Phenylmethylsulfonyl Fluorid, Aprotinin, Leupeptin, Benzamidinhydrochlorid, Dithiothreitol, Adenosintriphosphat, Triton X-100, Glycerol, Phosphatidylinositol und BSA (Fraktion V) wurden von Sigma Chemical Co (St. Louis, MO) geliefert. Silica-gel Dünnschichtchromatographie-Platten wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen, Protein G-Agarose und Protein A-Agarose waren von Pharmacia (Uppsala,Schweden) und Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Nitrocellulose Membranen (Optitran BA-S85) wurden von Schleicher und Schuell (Keene, NH), [γ–^{32}P]ATP von Amersham geliefert. Rekombinantes Human-Insulin (Humulin R) wurde von Eli Lilly & Co (Indianapolis, IN), rekombinantes IGF-1 von AF Schuetzdeller (Tübingen,Deutschland) und synthetisches
GLP-1 von Bachem (Bubendorf,Schweiz) bezogen. 5-Bromo-desoxyuridin (BrdU) Zellproliferationskits und ELISAs zur Ermittlung der Apoptoserate wurden von der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen. New England Biolabs (Beverly, MA) lieferten sowohl die PKBα/Akt-1 Antikörper und "Phospho"-spezifischen Antikörper für PKBα/Akt-1 als auch die Reagenzien für das Chemilumineszenzverfahren.
Antikörper gegen Gab-1,
IRS-1, monoklonales Phosphotyrosin (pY) und Insulinrezeptor β-Kette wurden von Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) geliefert. COOH-terminale Antikörper gegen IRS-1 und IRS-2 wurden von Drs. CR Kahn und MF White (Joslin Diabetes Center, Boston, MA) zur Verfügung gestellt. Reagenzien für SDS-PAGE erhielten wir von Bio-Rad (Hercules, CA), Reagenzien für die Zellkultur von Gibco (Karlsruhe, Deutschland) und alle anderen Chemikalien wurden von Sigma bezogen.

2. Zusammensetzung der Reagenzien

TBS-T(10x):

0,1 M Tris pH 7,5, 1,5 M Nacl, 0,2% Tween 20

Zellkulturmedium RPMI-1640 mit L-Glutamin :

10% FBS, 10 mM HEPES, 1 mM Natriumpyruvat, 50µM β-Mercaptoethanol, 100 iU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

Zell-Lysatpuffer:

1% Triton X-100, 10% Glycerol, 50 mM Hepes pH 7.4, 100 mM Natriumpyrophosphat, 100 mM Natriumfluorid, 10 mM EDTA, 5 mM Natriumvanadat, 10 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 1.5 mg/ml Benzamidin und 34 µg/ml PMSF

PBS : Phosphate-buffered saline

136,8 mM NaCl, 2,5mM KCl, 0,8 mM dibasisches Natriumphosphat, 1,47mM monobasisches Kaliumphosphat, 0,9 mM Calciumchlorid, 0,5mM Magnesiumchlorid-hexahydrat auf einen Liter Wasser

SDS Laufpuffer:

250mM Tris-Base, 192mM Glycin, 0,1% SDS, pH –Wert ca. 8,3

Westerntransferpuffer :

1x SDS mit 20% Methanol

Trenngelpuffer:

1,5M Tris-Base, 0,4%SDS in einem Volumen von 100ml ddH²O und einem pH-Wert von 8,8

Trenngel 8% :

4 ml Trenngelpuffer, 7,7 ml dd H_2O, 3,6ml Glycerol, 4,3 ml Polyacrylamid, 50 µl 10% APS und 25 µl Temed

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris-Base, 0,4%SDS in einem Volumen von 100ml ddH_2O und einem pH-Wert von 6,8

Sammelgel:

2,5ml Sammelgelpuffer, 5,9ml ddH_2O, 1,6ml Polyacrylamid, 60µl 10% APS und 30µl Temed

Lämmli-Reagenz (5x):

1% Bromphenolblau, 1M Natriumphosphat, 50% Glycerol, 5g SDS auf 50ml Ansatz, Auffüllen mit ddH2O, für 5x Laemmli 75 mg/ml DTT

Lösung zum Membranstrippen:
0,2 M Glycin pH 2,4, 1% SDS, Ansatz mit ddH2O

3. Zellkultur

Als Modell für eine β-Zell-Linie dienten die Insulinomazellen INS-1 (Passagen 80-120) aus dem Pankreas der Ratte. Die INS-1 Zellen stammten von Prof. Dr. Claes Wollheim (Asfari et al. 1992) Department of Medicine, Division de Biochemie Clinique, Genf (Schweiz). Das verwendete Medium RPMI-1640 mit Glukose (11mM) und L-Glutamin (2mM) enthielt zusätzlich 10% fetales Kälberserum (FCS), 10 mM HEPES, 1 mM Natriumpyruvat, 50µM β-Mercaptoethanol, 100 iU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Brutschranktemperatur betrug 37 °C. Die Atmosphäre war wasserdampfgesättigt bei einem Kohlendioxidgehalt der Luft von 5%. Hatten die Zellen eine Konfluenz von ungefähr 80% erreicht, wurden sie zweimal mit PBS gespült und über Nacht in Medium mit 10 mM Glucose ohne FCS gehalten. Eine Stunde vor der Stimulation fand ein erneuter Mediumwechsel statt, um von den Zellen möglicherweise selbst sezernierte Faktoren auszuwaschen.
Die Stimulation der Zellen erfolgte mit den Peptidhormonen Insulin, IGF-1 und GLP-1 in verschiedenen Konzentrationen (10pm bis 10µm) bei unterschiedlichen Stimulationszeiten. Nach Erreichen der gewünschten Stimulationszeit wurde das Medium entfernt und mit 4°C kaltem PBS nachgespült. Die Gewebekulturplatte wurde auf Eis gestellt, um weitere stimulationsinduzierte Veränderungen zu unterbinden, und mit 200 bis 500 µl Lysispuffer versetzt. Die so gewonnenen Zellextrakte wurden für 15 sec sonifiziert, anschließend mit 13000 U/min fünf Minuten bei 4°C in einer Mikrofuge zentrifugiert, um unlösliches Material zu entfernen. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mit Hilfe des Bradfordtestes bestimmt, auf eine Konzentration von 4µg/µl eingestellt und für Westernblots verwendet.

4. Proliferationsmessung

Die Messung des Bromo-desoxyuridin Einbaus (BrdU) dient dem Nachweis und der Quantifizierung von Zellwachstum. Hierbei wird die Neusynthese der DNA als Maß für Proliferation ermittelt. BrdU ist ein Pyrimidinanalogon, welches nach seiner Zugabe anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird. Nach

Zellfixierung sowie – denaturierung kann der BrdU-Einbau durch einen spezifischen Antikörper detektiert werden. Die Immunkomplexe werden mit einer Tetramethylbenzidin-haltigen Substratlösung versetzt. Die Reaktionsintensität lässt sich nun anhand der Absorptionsstärke messen, welche mit der DNA-Neusynthese korreliert. In unserem Versuch wurden INS-1 Zellen in einer Dichte von 3 x 10^3 in 96 Loch-Mikrotiterplatten ausgesät, wuchsen für 24 h in regulärem Medium, wurden einmal mit 10 mM PBS (pH 7.4) gewaschen und hungerten für 24 h in RPMI 1640 Medium ohne Kälberserum, Glucose und Natriumpyruvat. Anschließend wurden die Zellen für 24 h in RPMI 1640 Medium mit verschiedenen Glucosekonzentrationen und Testsubstanzen inkubiert. Während der letzten 6 Stunden Stimulationszeit wurden 20 µl einer BrdU Lösung hinzugefügt und der ELISA wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

5. Apoptose-Messung

Bei der Apoptose handelt es sich um einen physiologischen und aktiv gesteuerten Prozess, der zum regulierten und programmierten Absterben von Zellen führt. Dieser Prozess ist notwendig zur Aufrechterhaltung einer Gewebshomeostase – beispielsweise bei der Zellerneuerung. In apoptotischen Zellen kommt es durch sogenannte Endonucleasen zum Abbau der DNA, der im Cytoplasma zu einer Anreicherung von DNA-Bruchstücken in Form von Mono- und Oligonucleosomen führt. Diese cytoplasmatischen Histon -assoziierten DNA-Fragmente wurden mittels ELISA nach der quantitativen Sandwich- Enzym – Immunoassay Technik bestimmt. In unserem Versuchsaufbau wurden INS-1 Zellen in 24-Loch Gewebekulturschalen für 48 Stunden kultiviert, über einen Zeitraum von 12 Stunden in Hungermedium, d.h. Medium ohne FCS gehalten und nach Ablauf dieser Frist mit Glucose und den verschiedenen Testsubstanzen stimuliert. Daraufhin wurden die Zellen lysiert, zentrifugiert und die im gewonnenen Überstand enthaltenen DNA-Fragmente als Maßstab der Apoptoserate quantifiziert.

6. Immunopräzipitation und Immunoblotting

Die Immunopräzipitation isoliert das gewünschte Protein aus der Vielzahl der Antigene des Proteinlysates. Im Präzipitat bestimmt man das Antigen über das Molekulargewicht in der Sodiumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophore (SDS-PAGE).

Für Immunopräzipitationen wurden die Proteinlysate auf eine Proteinmenge von 500 µg in einem Volumen von 500 µl eingestellt. Die gewünschten Antikörper wurden je nach Empfehlung des Herstellers in einer Menge von 4 µg bis 10 µg eingesetzt und zusammen mit 80 µl Protein G- oder Protein A-Agarose für 2 bis 4 h bei 4 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die nach Zentrifugation gewonnenen Niederschläge wurden zweimal mit eiskaltem Proteinlysatpuffer gewaschen und entweder bei –80 °C tiefgefroren oder aber sofort in Form einer SDS-PAGE weiterverarbeitet. Zunächst wurden die Proben mit Lämmlireagenz im Verhältnis 1:1 Probenvolumen zu Reagenzlösung versetzt. Anschließend wurde das Lysat zwecks Denaturierung 10 min. auf 100°C aufgeheizt. Die SDS-PAGE dient der Auftrennung der Proteine. Verwendung fanden zweiphasige 8% Polyacrylamidgele. Die Geltaschen wurden jeweils mit 80 µg Protein beladen. Die Gellaufzeit betrug bei 130 V und einer Stromstärke von 300 mA etwa 90 min. Für die Gelelektrophorese wurde das EC 120 Mini Vertical Gel System von EC- Apparatus Corporation (Holbrook, New York) verwendet, so dass eindimensionale Minigele von 10x10 cm entstanden. Nach Beendigung der Gelelektrophorese fand der Westerntransfer auf eine Nitrocellulosemembran statt. Es wurde das BIO-RAD Minitransblot-System verwendet. Der Proteintransfer vom Gel zur Nitrocellulosemembran erfolgte entweder unter Kühlung bei 75 V in zwei Stunden oder über Nacht mit 20 V bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Membranen in 3% iger Trockenmilch in TBS-T bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geblockt.

Die geblockten Nitrocellulose-Membranen kamen im nächsten Arbeitsschritt in eine 3%ige bovine Serumalbumin (BSA)-Lösung in TBS-T (pH ca. 7,4), welche den ersten Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 enthielt. Der primäre Antikörper war entweder gegen die Gesamtform der PKB/Akt oder spezifisch gegen das phosphorylierte Ser 473 der Proteinkinase B gerichtet.

Die Membranen wurden bei Raumtemperatur unter ständigem leichten Schütteln für eine Stunde in der Antikörperlösung belassen, daraufhin 3x10 min. mit 1x TBS-T gewaschen und wiederum für eine Stunde in 3% Trochenmilchlösung in TBS-T inkubiert, welche diesmal den zweiten Antikörper in einer Konzentration von 1:2000

enthielt. Die Membranen wurden im Anschluss erneut 3x10 min. mit TBS-T gewaschen.

Die Inkubation mit dem ersten oder zweiten Antikörper konnte auch über Nacht bei 4°C erfolgen. Zur Visualisierung der von dem primären Antikörper detektierten PKB, wurde das „phototope HRP Westernblot detections kit LumiGLO“ der Firma New England Biolabs verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Chemilumineszenzverfahren. Die mit dem sekundärem Antikörper gekoppelte Peroxidase reagierte mit der Substanz Luminol – einem Bestandteil der Chemilumineszenzlösung. Die durch die Destabilisation von Luminol auftretende Lichtemission konnte mit Hilfe von Röntgenfilmen aufgefangen werden. Die Expositionsdauer lag zwischen 2h bis zu einem Tag. Die Filme wurden eingescannt und die Schwärzungsintensität der Banden untereinander wurde mit Hilfe der Gelscan 3D Software (BioSciTec, Marburg, Germany) quantifiziert. Um die Membranen auf denen die phosphospezifische PKB-Form bereits nachgewiesen war auch zum Nachweis der Gesamtform verwenden zu können, bot es sich an, die Membranen von den Antikörpern zu strippen und erneut zu verwenden. Dies wurde erreicht, indem die Membranen in einer Strippinglösung zwei Stunden im 65°C heißen Wasserbad unter ständigem Schütteln inkubiert wurden.

7. PI3K Aktivitätsmessung

Die PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositole in der 3D Position des Inositolringes in Anwesenheit von ATP. Im PI3K Assay wird die Lipidkinaseaktivität durch Dünnschichtchromatographie bestimmt. Zunächst wurde wie oben beschrieben eine Immunopräzipitation mit mindestens 200 bis 500µg Protein durchgeführt.. Die gewonnenen Immunkomplexe wurden in einer 55 µl Reaktionslösung inkubiert, die 200 µM ATP, 5 µCi [γ-^{32}P]ATP, 200 mM $MgCl_2$ und 5 µg Phosphatidylinositol enthielt. Die Dauer der Inkubation betrug 20 min. bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde unterbrochen durch Zugabe von 150 µl $CHCl_3$/CH_3OH/11.6 N HCl (33:66:0.6). Anschließend wurde zu jeder Probe 120 µl $CHCL_3$ hinzugefügt. Die organische Phase wurde durch einminütige Zentrifugation mit 15.000 rpm abgetrennt, in ein anderes Eppendorfgefäß überführt und einmal mit 150 µl CH3OH/1N HCl (1:1), 20 µl 8 N HCl und 160 µl $CHCl_3$/methanol 1:1 gewaschen. Die organische Phase wurde wiederum durch Zentrifugation abgetrennt, die Lipide mit Hilfe einer Vacuum - Zentrifuge konzentriert, erneut in 20 µl Chloroform gelöst und auf Silica-gel

Dünnschichtchromatographie Platten aufgetropft. Für den Zeitraum von mindestens 1 h wurden die Platten in $CHCl_3/CH_3OH/H_2O/NH_4OH$ (60:47:11.3:2) entwickelt und getrocknet. Der Röntgenfilm wurde mindestens über einen Zeitraum von zwei Tagen aufgelegt.

8. PKB/Akt Assay

Die Proteinkinase B ist eine „Kinase“. Ihre Serinkinaseaktivität kann in einem nichtradioaktiven Versuchsaufbau nachgewiesen werden. Zunächst wurde die PKB/Akt immunopräzipitiert. In der Immunopräzipitation wurde eine Proteinmenge von ungefähr 300 µg eingesetzt. Die gewonnenen Immunopräzipitate wurden mit 1µg GSK-3 Fusionsprotein, 200 µM ATP und 40 µl Kinasepuffer für 30 min. bei 30°C inkubiert. Das GSK-3 Fusionsprotein besteht aus Paramyosin fusioniert mit GSK-3 α/β kreuzreagierend zu Anteilen um GSK-3 α/β (Ser 21/9) (CGPKGPGRRGRRRTSSFAEG). Der Paramyosinanteil wurde von E. coli produziert. Terminiert wurde die Reaktion durch Zugabe von 40µl 2x Lämmli-Reagenz. Im Anschluß daran wurden die Proben 5 min gekocht. Die GSK-3 ist ein Substrat der PKB/Akt und wird von dieser phosphoryliert und damit inaktiviert. Ist die immunkomplex gebundene PKB/Akt nun im aktiven Zustand, kommt es zur Phosphorylierung der GSK-3, die im Westernblot nachgewiesen werden kann. Dazu wurde ein phosphospezifischer polyklonaler Antikörper eingesetzt, welcher die GSK-3 nur detektieren kann, wenn die Isoform GSK-3α an Ser 21 oder die GSK-3β an Ser9 phosphoryliert vorliegt.

C Ergebnisse

1. Proliferative Effekte von Insulin, IGF-1 und GLP-1

Zu Beginn wurde die Proliferationsrate in der β-Zellkultur INS-1 nach Stimulation mit GLP-1, Insulin und IGF-1 ermittelt. Dadurch sollte herausgefunden werden, ob diese Peptide als Wachstumsfaktoren auf INS-1 Zellen wirken. Die Wachstumsrate wurde durch Messung der DNA-Synthese im 5-Bromo-deoxyuridin (BrdU) Inkorporationsassay ermittelt (siehe Methoden) (Huong PL et al. 1991). Der BrdU Einbau bei 0 mM Glucose ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren diente als Kontrollwert. Der Kontrollwert wurde als 100% definiert. Wurden die β-Zellen durch steigende Glucosekonzentrationen von 5-20 mM stimuliert, so konnte ein Proliferationsanstieg bis zu einer Glucosekonzentration von 15 mM gemessen werden. Bei einer Glucosekonzentration von 20 mM war die Proliferationsrate im Vgl. zu 15 mM rückläufig (0 mM: 100%; 5 mM: 270±23%; 10 mM: 450±34%; 15 mM: 680±56%; 20 mM: 660±71%; Mittelwert ±SEM der Kontrolle; n=12; Abb. 2a). Die zusätzliche Stimulation der INS-1 Zellen mit 100 nM Insulin, 10 nM IGF-1 und 100 nM GLP-1 hatte keinen signifikanten Effekt bei einer Glucosekonzentration von 0 mM (Insulin: 132±11%; IGF-1: 120±14%; GLP-1: 114±9%, n=12) und führte auch bei 5 mM Glucose nur zu einem geringfügigen Proliferationsanstieg (Insulin: 390±45%; IGF-1: 360±25%; GLP-1: 360±34%; n=12). Im Gegensatz dazu stieg die durch Insulin induzierte DNA-Synthese bei einer Glucosekonzentration von 10 mM um das 1.3-fache an. Bei IGF-1 und GLP-1 kam es zu einem 1.75-fachen Anstieg des BrdU-Einbaus (Insulin: 600±67%; IGF-1: 790±87%; GLP-1: 790±95%; n=12). Bei 15 mM Glucose im Stimulationsmedium trat ein relativer Abfall der BrdU Inkorporationsrate auf und zwar für Insulin auf das 1.23-fache, für IGF-1 auf das 1.22-fache und für GLP-1 auf das 1.16-fache (Insulin: 840±53%; IGF-1: 830±43%; GLP-1: 790±76%). Für Insulin setzte sich diese absteigende Tendenz auch bei 20 mM Glucose fort, GLP-1 und IGF-1 hingegen erreichten bei 20 mM ihre Maximalwerte (Insulin: 816±54%; IGF-1: 884±45%; GLP-1: 925±61%; n=12).

2. Anti-apoptotische Wirkung von Insulin, IGF-1 und GLP-1

Die Apoptoserate der INS-1 Zellkultur wurde über die Messung cytosolischer histon-assoziierter DNA-Fragmente ermittelt (Oehm A et al. 1992). Als Kontrolle diente die Apoptoserate von Zellen, die bei 10 mM Glucose und 10% FBS gehalten wurden. Die Kontrolle wurde als 100% eingesetzt. Die Apoptose war bei 0 mM Glucose 5-fach erhöht (492% im Vgl. zur Kontrolle; n=4), konnte aber deutlich gesenkt werden (auf 228%), wenn die Glucosekonzentration auf 5 mM angehoben wurde. Bei 10 mM Glucose kam es zu einem weiteren Absinken der apoptotischen Aktivität (132%) bis nahezu in den Bereich der Positivkontrolle. Eine weitere Anhebung der Glucosekonzentration führte nur zu einer geringen zusätzlichen Apoptoseinhibition (122% bei 15 mM und 112% bei 20 mM). Bei 0 mM Glucose konnten 100 nM Insulin, 10 nM IGF und 100 nM GLP-1 kaum zu einer Inhibition der Apoptose beitragen (Insulin: 452±29%; IGF-1: 339±29%; GLP-1: 432±29%; Mittelwert ± SEM der Kontrolle; n=4). Im Gegensatz dazu konnte die Apoptoserate durch die Gabe der drei Peptide bei 5 mM Glucose (Insulin: 168±28%; IGF-1: 157±32%; GLP-1: 152±9%) und bei 10 mM Glucose (Insulin: 59±7%; IGF-1: 80±13%; GLP-1: 68±13) deutlich gesenkt werden. Stieg die Glucosekonzentration im Stimulationsmedium aber auf Werte über 10 mM, bewirkten Insulin, IGF-1 und GLP-1 keine weitere Abnahme der Apoptoserate (15 mM Glucose: Insulin: 89±8%; IGF-1: 81±10; GLP-1: 100±9% und 20 mM Glucose: Insulin: 91±10; IGF-1: 78±10%; GLP-1: 88±12%; Abb. 2b).

In den folgenden Versuchsreihen wurde die durch GLP-1, Insulin und IGF-1 induzierte Signaltransduktion ermittelt.

Die PKB/Akt ist eine Serin-/Threoninkinase. Im aktivierten Zustand nimmt die PKB/Akt nicht nur Einfluss auf die Zellproliferation und Glucoseaufnahme der Zelle, sondern inhibiert auch apoptotische Signalwege. Aufgrund der herausragenden Bedeutung der Proteinkinase B wurde zunächst ihre Aktivierung durch Insulin, IGF-1 und GLP-1 untersucht.

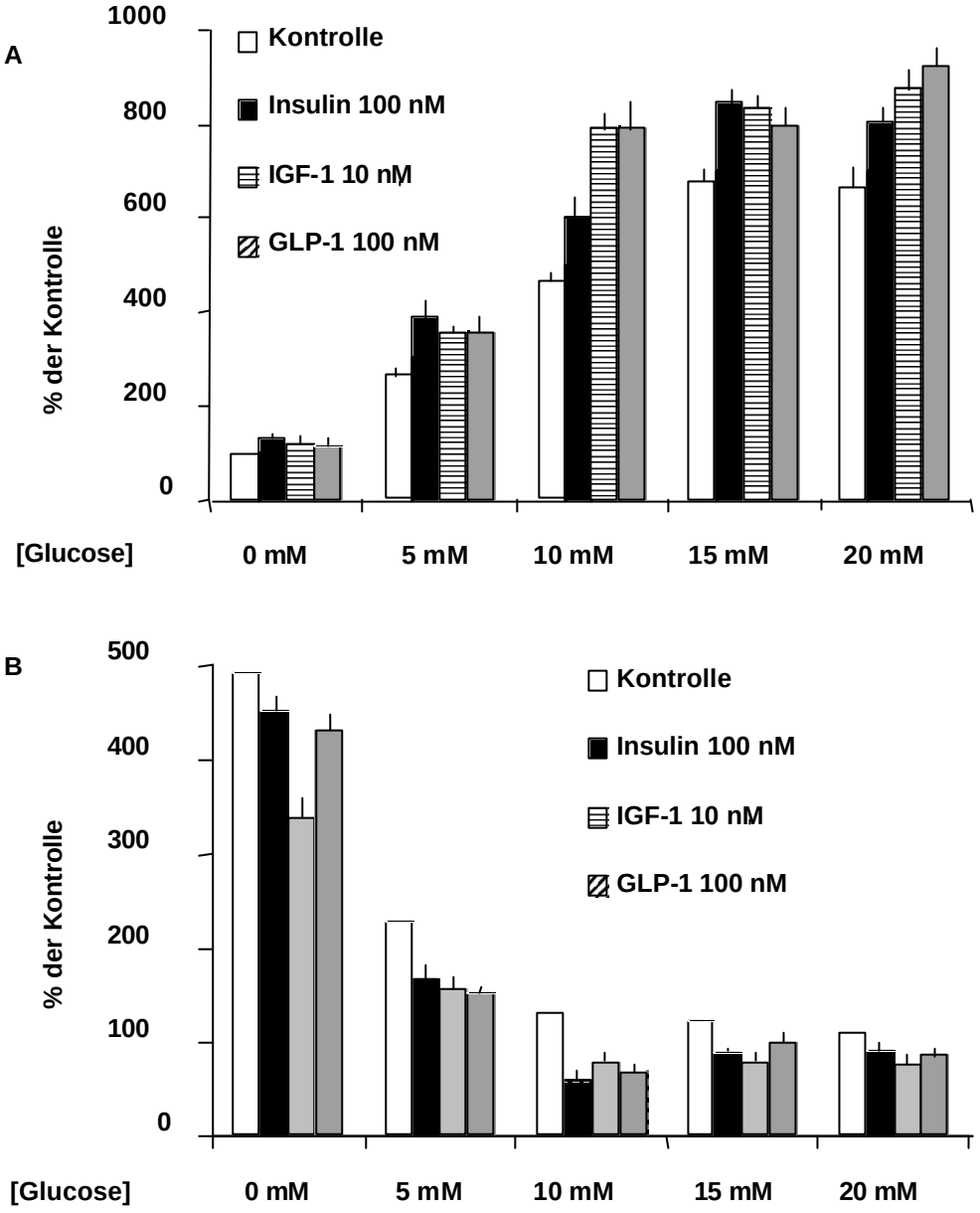

Abb. 2. Proliferation (**A**) und Apoptoserate (**B**) in INS-1 Zellen. INS-1 Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium inkubiert und anschließend bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen über einen Zeitraum von 24h mit 100 nM Insulin , 10 nM IGF-1 und 100 nM GLP-1 stimuliert. In den letzten sechs Stunden der Stimulationsperiode wurde 5-Bromo-desoxyuridin in das Zellmedium pipettiert. Durch Messung mittels ELISA konnte die metabolische Aktivität der Zellen ermittelt werden. Jede Säule repräsentiert den Mittelwert ± SEM (Standard Error of Mean) von 12 unabhängigen Experimenten. Sie werden im Verhältnis zum Kontrollwert angegeben, der den Wert 100% bekommt.

B. Die Apoptoserate wurde durch Messung der cytoplasmatischen histon-assoziierten-DNA-Fragmente mit Hilfe der ELISA ermittelt. Jeder Balken steht für den Mittelwert ± SEM von 4 unabhängigen Experimenten. Sie werden im Verhältnis zum Kontrollwert, der den Wert 100% bekommt, angegeben. Die Kontrolle wurde mit 10 mM Glucose und 10 % FBS stimuliert.

3. Proteinkinase B (PKB) /Akt Isoformen

Von der PKB/Akt sind drei verschiedene Isoformen bekannt. Daher wurde untersucht, welche Isoformen in den verwendeten INS-1 Zellen detektierbar waren. Im Westernimmunoblot von INS-1 Zellen konnten mit isoformspezifischen Antikörpern die Isoformen PKBα/ Akt 1 und PKBβ/Akt 2 in mengenmäßig etwa entsprechender Ausprägung nachgewiesen werden. Die Isoform PKBγ konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

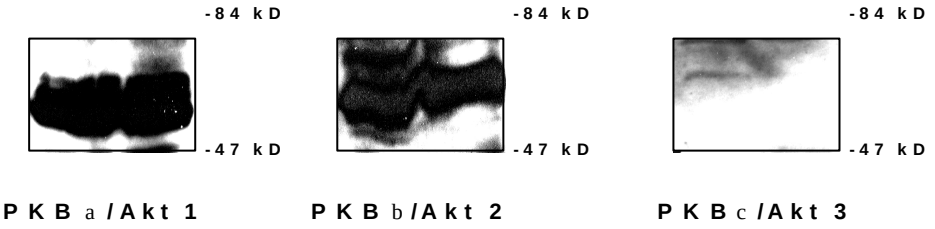

Abb. 3. PKB/Akt Isoformen in INS-1 Zellen
Zell-Lysate der INS–1 Zellen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend wurde ein Westernblot durchgeführt. Im nachfolgenden Immunoblot wurden Antikörper gegen die drei bekannten PKB–Isoformen verwendet. Dargestellt sind repräsentative Westernblots.

4. Zeitverlauf der PKB/Akt Phosphorylierung

Die Kinetik der PKB/Akt Phosphorylierung wurde bei 10 mM Glucose untersucht. Insulin, IGF-1 und GLP-1 wurden in einer Konzentration von 10 nM verwendet. Die Phosphorylierung der PKB/Akt wurde mit Hilfe des pSer^{473} PKB? /Akt-1 Antikörpers aktivierungsspezifisch nachgewiesen. Die höchste PKB/Akt Phosphorylierung konnte mit Insulin nach 3 min. (244± 28% im Vgl. zur Kontrolle; Abb.4) und mit IGF-1 nach 20 min. (747±212%; beide n = 6-10; Abb.4) erreicht werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Stimulation mit GLP-1 einen langsameren und insgesamt schwächeren Reaktionsverlauf: Eine Phosphorylierung der PKB/Akt wurde erst nach 180 min. sichtbar und erreichte ihr Maximum nach einer Stimulationszeit von 360 min.

(239±37%; n = 10; Abb. 4). Die PKB/Akt erreichte erneut ihren Basalwert nach Entfernung der Liganden aus dem Medium nach Ablauf von 30 min. (Daten nicht abgebildet). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von GLP-1, wurden die INS-1 Zellen nicht länger als 360 min. stimuliert. Bei der Verwendung von 100 nM GLP-1 wurde ein Spitzenwert der PKB/Akt Phosphorylierung (2.5-fach) nach 60 min. erreicht; nach 90 min. kam es zu einem Abfall der Phosphorylierungsintensität (hier nicht gezeigt). Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, die durch Insulinfreisetzung der INS-1 Zellen auftreten könnten, wurden die Kontrollen sowohl am Anfang als auch am Ende eines Versuches gewonnen. Die Kontrollen am Ende der Stimulationsperioden wurden für die quantitative Auswertung der erhaltenen Ergebnisse genutzt.

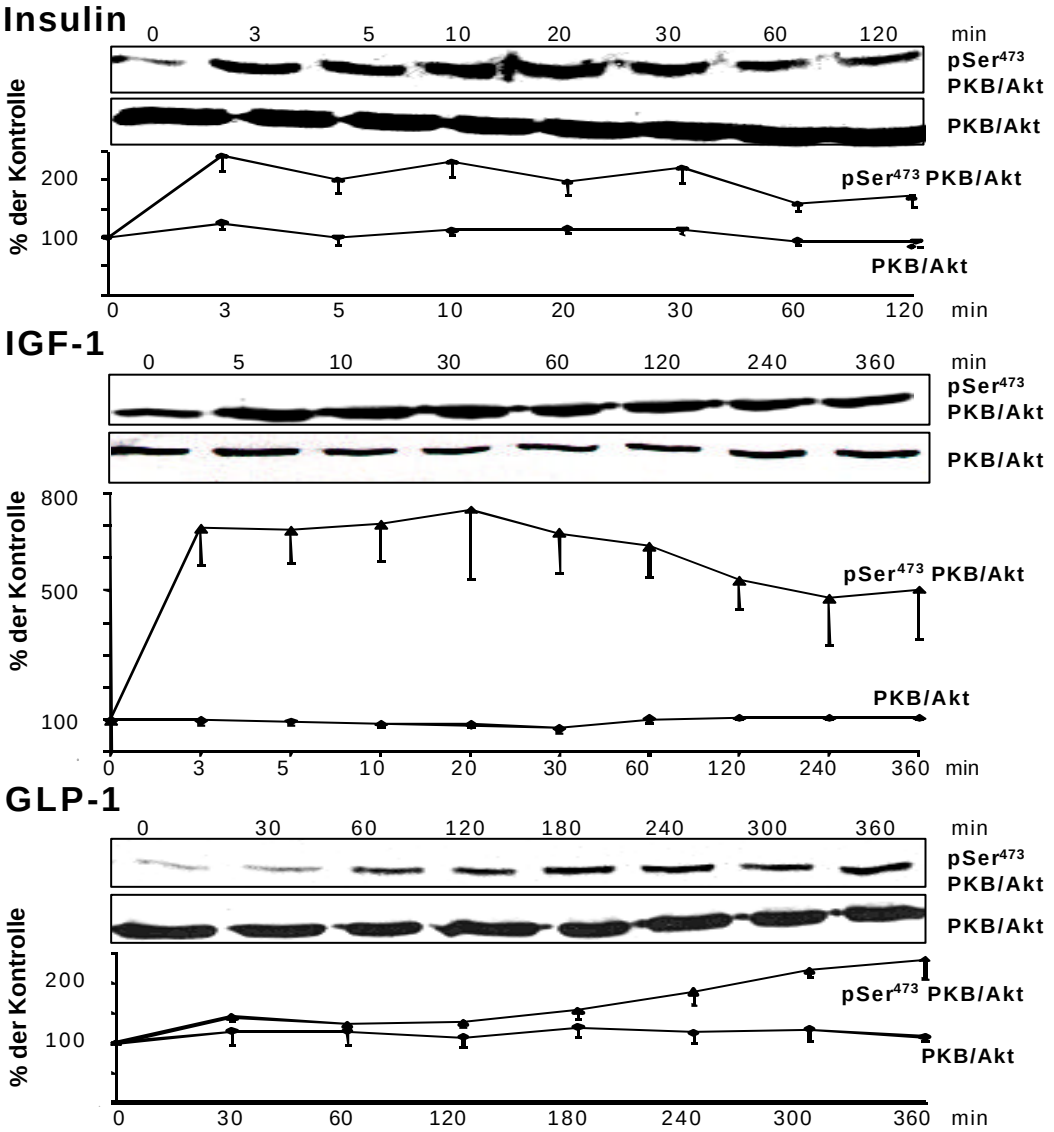

Abb.4

5. Dosisabhängigkeit der PKB/Akt Phosphorylierung

Im nächsten Untersuchungsschritt wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung der PKB/Akt Phosphorylierung durch Insulin, IGF-1 und GLP-1 näher betrachtet. Dazu wurden INS-1 Zellen über Nacht gehungert und anschließend mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen bei 10 mM Glucose eine Zeitspanne von 10 min. (Insulin und IGF-1) oder 240 min. (GLP-1) stimuliert. Die stärkste PKB/Akt Phosphorylierung durch Insulin wurde mit 1 µM (696±150% über dem Kontrollwert; Mittelwert ±SEM; n=6; Abb.5) erreicht. Der durch IGF-1 erreichte Maximalwert der PKB/Akt Aktivierung war geringfügig höher als nach Insulinstimulation, allerdings wurde eine 100-fach niedrigere Ligandenkonzentration dazu benötigt (10 nM IGF-1; 749±120%; n=6). Höhere IGF-1 Konzentrationen führten zu einem Absinken der PKB/Akt Aktivität (Abb.5).

Die Stimulation mit GLP-1 in einer Konzentration von 10 nM führte zu einer Aktivierung der PKB/Akt (174±20% im Vgl. zur Kontrolle; n=6). Die PKB/Akt Phosphorylierung nahm bei einer Stimulationsdosis von 100 nM GLP-1 (202±22%) oder 1 µM GLP-1 (220±30%; alle n=6; Abb. 5) nur geringgradig zu. Das unterschiedliche Ansprechen der PKB/Akt auf die Stimulation mit Insulin, IGF-1 und GLP-1 in INS-1 Zellen zeigte sich auch in der halb-maximalen PKB/Akt Antwort auf die Stimulation mit diesen Liganden. Die halb-maximale Antwort der PKB/Akt Aktivierung durch Insulin (zwischen 10 nM und 100 nM) war ungefähr
100 mal niedriger als die durch IGF-1 induzierte Aktivität (zwischen 100 pM und 1 nM). Die halb-maximale Antwort der PKB/Akt durch Stimulation mit unterschiedlichen GLP-1 Konzentrationen zeigte sich bei ungefähr 10 nM und lag damit in einem mit den Insulinwerten vergleichbaren Bereich (Abb.5).

Text zu Abb.4. Zeitverlauf der PKB-Stimulation durch Insulin, IGF-1 und GLP-1. INS-1 Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium inkubiert und anschließend bei 10 mM Glucose mit 100 nM Insulin, 10 nM IGF-1 und 100 nM GLP-1 stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, 100 µg Protein in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Der Grad der PKB-Aktivierung konnte anhand des phosphospezifischen Antikörpers gegen $pSer^{473}$ PKBα nachgewiesen werden. Die Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM aus 6-10 unabhängigen Experimenten. Sie stehen in Relation zur Kontrolle aus nicht stimulierten Zellen, die im Fall von Insulin nach 120 min und im Fall von GLP-1 und IGF-1 nach 360 min. gewonnen wurde. Der Kontrolle wurde der Wert 100% zugeordnet.

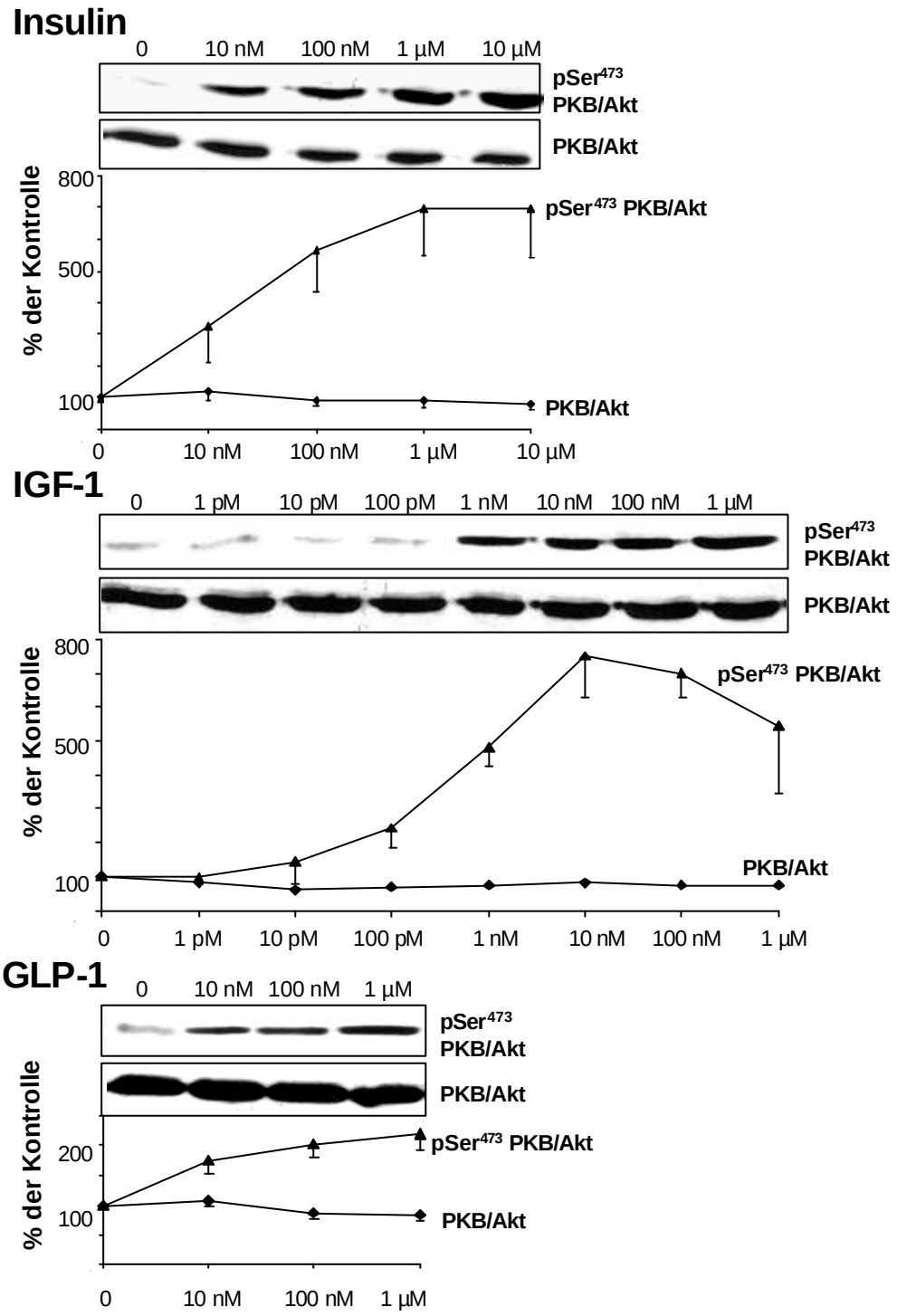

Abb. 5. Dosisabhängigkeit der PKB/Akt Phosphorylierung durch Insulin, IGF-1 und GLP-1. INS-1 Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium kultiviert. Im Anschluss daran wurden sie mit unterschiedlichen Hormonkonzentrationen über einen Zeitraum von 10 min. (Insulin und IGF-1) oder 240 min. (GLP-1) stimuliert. Die Glucosekonzentration des Stimulationsmediums betrug 10 mM. Die Zellen wurden methodisch wie bei der Ermittlung des Zeitverlaufes weiterbehandelt (siehe dort). Die Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM aus 6 unabhängigen Experimenten. Als Kontrollwert, der als 100% definiert wird, dienten nicht stimulierte Zellen. Die Kontrollen wurden gemeinsam mit den stimulierten Zellen geerntet; bei Insulin und IGF-1 nach 10 min. und bei GLP-1 nach 240 min.

6. Glucoseabhängigkeit der PKB/Akt Aktivität

Nachdem in den Zellproliferations- und Apoptoseversuchen die Hormonwirkung glucoseabhängig gewesen war, wurde auch die durch Insulin, IGF-1 und GLP-1 hervorgerufene PKB/Akt Phosphorylierung hinsichtlich ihrer Glucoseabhängigkeit untersucht. Zu diesem Zweck wurden INS-1 Zellen mit 10 nM Insulin, IGF-1 und GLP-1 stimuliert, nachdem sie über Nacht in unterschiedlichen Glucosekonzentrationen inkubiert worden waren. Das Stimulationsmedium wies die dem Hungermedium entsprechenden Glucosegradienten von 2,5 mM bis 20 mM auf. Die Stimulationszeit betrug für Insulin und IGF-1 10 min., für GLP-1 hingegen 360 min. Die PKB/Akt Phosphorylierung stieg mit zunehmender Glucosekonzentration an und zeigte bei 10 mM Glucose eine Verdopplung. Dieser Wert stieg bis zu einer Glucosekonzentration von 20 mM nur noch geringgradig weiter an (2.5 mM Glucose 100±0%; 5 mM Glucose 115±23%; 10 mM Glucose 192±26%; 20 mM Glucose 205±35%; im Vgl. zu 2.5 mM Glucose als Kontrolle; Mittelwert±SEM; n=7; Abb. 6). Die Stimulation mit Insulin führte zu einem Anstieg der PKB/Akt Phosphorylierung. Bei einer Glucosekonzentration von 2,5 mM lag diese Zunahme allerdings nur wenig höher als die PKB Aktivität der nicht stimulierten Kontrollzellen. Bei 5 und 10 mM Glucose kam es durch die Stimulation mit Insulin zu einer Zunahme der PKB/Akt Phosphorylierung um den Faktor 2. Bei 20 mM Glucose trat wieder eine Abnahme der PKB/Akt Phosphorylierung auf (2.5 mM Glucose 153±24%; 5 mM Glucose 201±30%; 10 mM Glucose 350±72%; 20 mM Glucose 291±43%; im Vgl. zu 2.5 mM Glucose als Kontrollwert; Mittelwert±SEM; n=4; Abb. 6). IGF-1 induzierte bei allen Glucosekonzentrationen gleichermaßen eine 6-8fache Steigerung der PKB/Akt Phosphorylierung. Der Maximalwert der PKB/Akt Aktivierung durch IGF-1 wurde bei 10 mM Glucose erreicht und fiel bei 20 mM Glucose wieder geringgradig ab (2.5 mM Glucose 609±138%; 5 mM Glucose 933±310%; 10 mM Glucose 1483±684%; 20 mM Glucose 1211±468%; im Vgl. zu 2.5 mM Glucose als Kontrolle; Mittelwert ±SEM; n=3; Abb.6). Wurden INS-1 Zellen bei verschiedenen Glucosekonzentrationen mit GLP-1 stimuliert, so resultierte bei 2.5 mM und 5 mM Glucose eine Steigerung der PKB/Akt Phosphorylierung um den Faktor 3, während dieser Effekt bei höheren Glucosekonzentrationen schwächer ausgeprägt war. So fand sich bei 10 mM und 20 mM Glucose nur ein zweifacher Anstieg der PKB/Akt Phosphorylierung im Vgl. zur

Kontrolle (2.5 mM Glucose 316±128%; 5 mM Glucose 390±121%; 10 mM Glucose 418±164%; 20 mM Glucose 517±157; im Vgl. zu 2.5 mM Glucose als Kontrollwert; Mittelwert±SEM; n=4; Abb. 6).

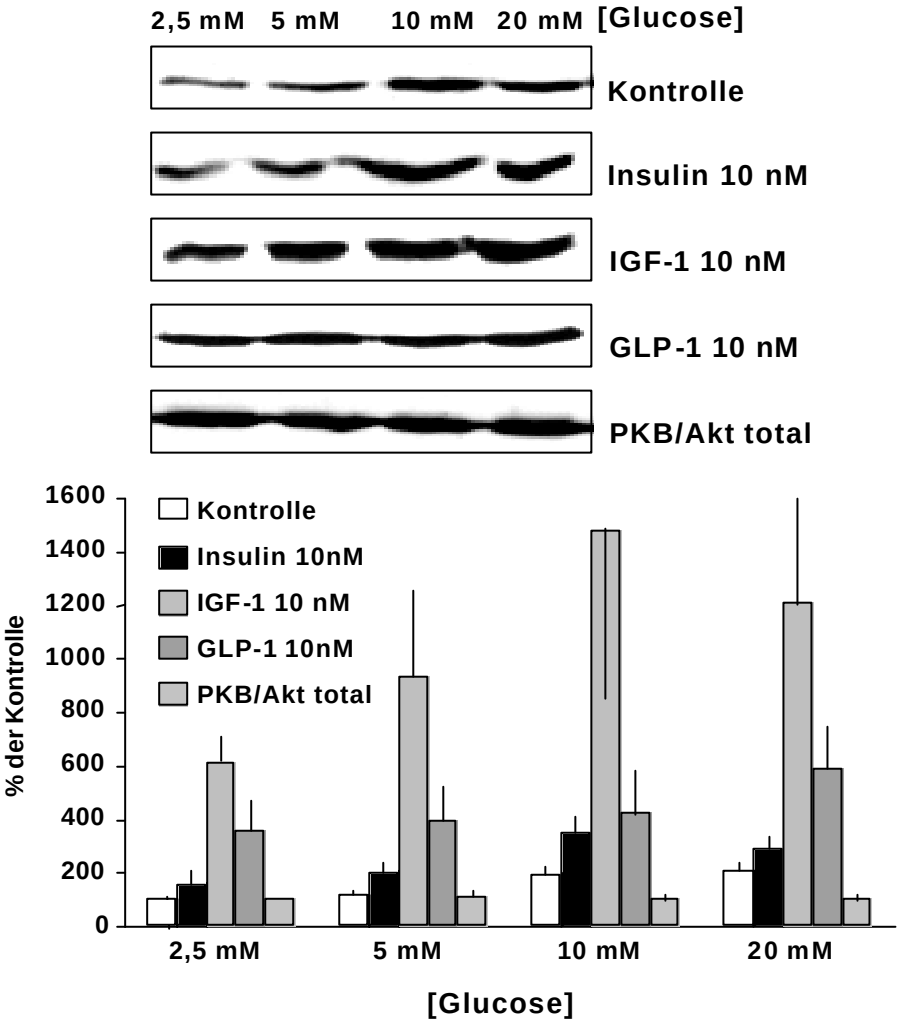

Abb.6. Glucoseabhängigkeit der PKB/Akt Phosphorylierung nach Insulin, IGF-1 und GLP-1 Stimulation. INS-1 Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium kultiviert und anschließend mit 10 nM Insulin, IGF-1 und GLP-1 stimuliert. Die Glucosekonzentrationen im Stimulationsmedium betrugen 2.5 mM, 5 mM, 10 mM und 20 mM Glucose bei einer Stimulationszeit von 10 min. (Insulin und IGF-1) oder 240 min. (GLP-1). Die Zellen wurden lysiert und - wie im Kapitel Methoden beschrieben- weiter verarbeitet. Die Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von 3-6 unabhängigen Versuchen. Die entsprechende Kontrolle mit dem Wert 100% wurde aus nicht stimulierten Zellen gewonnen, die bei einer Glucosekonzentration von 2.5 mM gehalten wurden.

7. Serinkinase -Aktivität der PKB/Akt

In den vorangegangenen Versuchen wurde die PKB/Akt Phosphorylierung mit dem aktivierungsspezifischen anti-pSer^{473} Antikörper nachgewiesen. Durch das folgende Experiment wurde die Serinkinase-Aktivität der phosphorylierten PKB/Akt nachgewiesen. Die Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) ist ein Zielprotein der PKB/Akt und wird durch diese phosphoryliert. Folglich kann durch die Phosphorylierung der GSK-3 eine Aussage über die Serinkinase-Aktivität der phosphorylierten PKB/Akt getroffen werden.

INS-1 Zellen wurden über einen Zeitraum von 10, 30, 60 und 90 min. mit 100 nM GLP-1 stimuliert. Anschließend wurden Immunopräzipitationen mit den Antikörpern anti-PKB/Akt α, anti-PKB/Akt β und mit dem phosphospezifischen Antikörper pSer^{473} durchgeführt. Die Immunopräzipitate wurden im PKB/Akt Assay (siehe Kapitel Methoden) mit einem Fusionsprotein der GSK-3 α/β inkubiert. Nach SDS-PAGE und Westerntransfer wurde im Immunoblot mit dem Antikörper pGSK-3 α/β die Phosphorylierung des GSK-3 Fusionsproteins nachgewiesen. In den Immunopräzipitaten der PKB/Akt war nach GLP-1 Stimulation im Immunoblot mit dem pGSK-3 α/β Antikörper eine Zunahme der GSK-3 Phosphorylierung zu erkennen. Die GSK-3 Phosphorylierung war in Immunopräzipitaten der phosphorylierten PKB/Akt am stärksten ausgeprägt (Abb. 7).

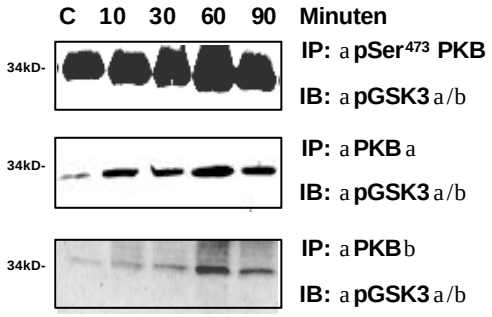

Abb.7 Serinkinase-Aktivität der PKB/Akt
Nachdem INS-1 Zellen über Nacht in serumfreien Medium hungerten, wurden sie über einen Zeitraum von 10, 30, 60 und 90 min. mit 100 nM GLP-1 stimuliert. Das Stimulationsmedium enthielt 10 mM Glucose. Das im Anschluss gewonnene Zell-Lysat wurde auf gleiche Proteinkonzentrationen in gleichen Volumina eingestellt und mitAntikörpern gegen pSer^{473}, PKB α und PKB β immunopräzipitiert. Nach SDS-PAGE und Westerntransfer auf Nitrocellulosemembranen, wurde ein Immunoblot mit anti-pGSK3 α/β durchgeführt. Abgebildet sind repräsentative Blots aus 3 unabhängigen Experimenten.

8. Effekte von PKB/Akt Mutanten auf die metabolische Aktivität von INS-1 Zellen

Insulin, IGF-1 und GLP-1 konnten INS-1 Zellen vor Apoptose schützen und ihre zelluläre Proliferation fördern (Abb.2). Die drei Peptidhormone waren in der Lage, die PKB/Akt zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Um die Rolle der PKB/Akt in der Zellproliferation zu untersuchen, wurden INS-1 Zellen mit mutierten PKB/Akt Isoformen stabil transfiziert. Die mutierten PKB/Akt Isoformen wurden eingesetzt, da z.Zt. kein adäquater pharmakologischer Inhibitor der PKB/Akt existiert. Die zur Verfügung stehenden indirekten PKB/Akt-Inhibitoren, deren Angriffsort die PI3K darstellt, würden das Bild verzerren, denn auf diese Weise wäre der Einfluss anderer PKB/Akt Aktivatoren wie beispielsweise der PKA oder der CaM-KK nicht abgrenzbar.

Zum einen wurde die dominant negative PKB? /Akt-1 (K179M) Mutante und zum anderen eine konstitutiv aktive PKB/Akt Mutante verwendet. Letztere erhielt man, indem am NH_2-terminalen Ende eine myristoylierte Sequenz (myr-Akt1) angeheftet wurde. Schließlich wurden INS-1 Zellen mit dem leeren Vektor (pUSE) stabil transfiziert. Die Expression der mutierten PKB/Akt Isoformen in INS-1 Zellen wurde in anti-c-myc und anti-PKB/Akt Immunopräzipitaten und im anti-c-myc und anti-pSer^{473} PKB/Akt Immunoblot nachgewiesen (Abb.8).

In beiden Zell-Linien zeigte sich ein 60 kDa c-myc assoziiertes Protein, welches mit anti-PKB/Akt Antikörpern immunopräzipitiert werden konnte.

Die drei Zell-Linien wurden mit 10% FBS und 10 mM Glucose stimuliert. Ein im Anschluss durchgeführtes Proliferationsassay auf Tetrazoliumbasis diente zur Bestimmung der metabolischen Aktivität. Die Zell-Linie mit dem leeren Vektor (pUSE) bekam für ihre gemessene metabolische Aktivität den Wert 100% zugeordnet (SEM±2%; n=12). In K179M transfizierten Zellen fand sich eine um 34% reduzierte metabolische Aktivität (SEM±2%) und auch myr-Akt-1 transfizierte Zellen zeigten eine um 23% verringerte metabolische Aktivität (SEM±4.6%). Die Erklärung für dieses zunächst unerwartete Ergebnis war, das die konstitutiv aktive myr-Akt-1 Mutante an die Zellmembran gebunden bleibt. Um ihre Wirkung entfalten zu können, muss die aktivierte Proteinkinase B/Akt aber von der Plasmamembran dissoziieren, um zum Zellkern zu gelangen (Coffer PJ et al. 1998).

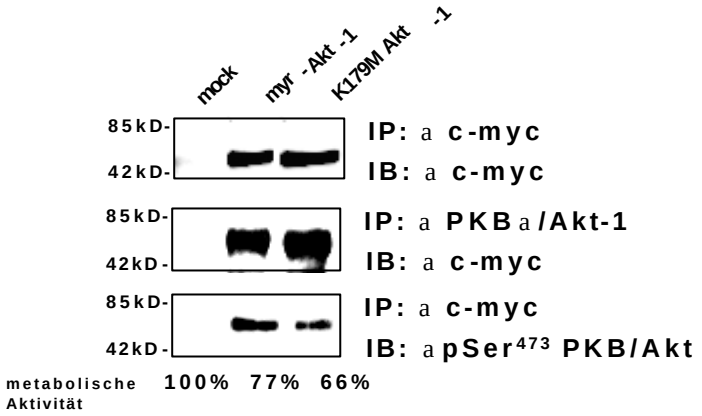

Abb. 8. Expression von PKB/Akt Mutanten und ihr Effekt auf die metabolische Aktivität in INS-1 Zellen. INS-1 Zellen wurden stabil transfiziert. Zum einen mit dem leeren Expressionsvektor (pUSE), zum anderen mit einer konstitutiv aktiven Mutante der PKB/Akt (myr-Akt-1) und schließlich einer dominant negativen Form der Proteinkinase B (K179M Akt-1). Die Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium gehalten. Aus ihnen wurde Zell-Lysat gewonnen, von welchem gleiche Mengen zur Immunopräzipitation eingesetzt wurden. Die in der Immunopräzipitation verwendeten Antikörper waren gegen c-myc und PKB/Akt gerichtet. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im nachfolgenden Western-Immunoblot mit Antikörpern gegen c-myc und $pSer^{473}$ PKB/Akt inkubiert. Gezeigt sind repräsentative Blots aus 3 unabhängigen Experimenten. Die metabolische Aktivität der INS-1 Zellen mit mutierten PKB/Akt Isoformen ist im Verhältnis zu den (pUSE)- transfizierten Kontrollzellen angegeben. Den Kontrollzellen wurde der Wert 100% zugeordnet.

Nachdem die PKB/Akt Aktivierung durch Insulin, IGF-1 und GLP-1 weitgehend charakterisiert worden war, wurden anschließend die der PKB/Akt vorgeschalteten Signalmodule untersucht.

9. Phosphorylierung von IRS-Isoformen und PI3K Aktivierung

Die Stimulation der Insulin- und IGF-1 Rezeptoren durch ihre jeweiligen Liganden führt zu einer Autophosphorylierung der katalytischen β-Untereinheit der Rezeptoren, welche eine Phosphorylierung nachgeschalteter IRS-Isoformen induziert. Durch die phosphorylierten IRS Isoformen wird die p85α Untereinheit der PI 3K rekrutiert und aktiviert.

Mit diesem Experiment wurde untersucht, ob die Stimulation von INS-1 Zellen mit Insulin und IGF-1 glucoseabhängig eine Aktivierung dieser frühen Proteine des Signalweges nach sich zieht. Zunächst wurden INS-1 Zellen bei einer Glucosekonzentration von 0 mM und 10 mM mit 100 nM Insulin oder 10 nM IGF-1 stimuliert. War im Stimulationsmedium keine Glucose vorhanden, so phosphorylierten Insulin und IGF-1 die β-Kette des Insulinrezeptors nur minimal bis gar nicht (Abb.9A). Ebenso verhielt es sich bei IRS-1 (Abb.9B), IRS-2 (Abb.9C) und der Rekrutierung der regulatorischen p85α Untereinheit der PI3K durch IRS-2 (Abb.9 D). Auch bei mit p85α Komplexgebundenen IRS-1 und IRS-2, die bei einem Molekulargewicht von 160-180 kDa laufen, nahm die Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation nicht zu (Abb. 9 E). Bei 10 mM Glucose kam es zur Phosphorylierung von Tyrosinresten der β-Kette des Insulinrezeptors (Abb.9A). Durch IGF-1 Stimulation konnte bei 10 mM Glucose eine Tyrosinphosphorylierung des Insulinrezeptors nachgewiesen werden. Nach IGF-1 Stimulation kam es zu Hybridbildungen zwischen Untereinheiten des Insulinrezeptors und des IGF-1 Rezeptors, die in IGF-1 stimulierten Immunopräzipitaten des Insulinrezeptors als zusätzliche Bande bei 95 kDa zu erkennen sind (Abb. 9A). Bei 10 mM Glucose bewirkten Insulin und IGF-1 einen Anstieg der Tyrosinphosphorylierung von IRS-1 (Abb.9B), IRS-2 (Abb.9C) und der Rekrutierung von p85α durch IRS-2 (Abb.9D). Bei dieser Glucosekonzentration wurde auch bei 160-180 kDa eine Bande tyrosinphosphorylierter Proteine sichtbar; es handelte sich um komplexgebundenes IRS-1 und IRS-2 an p85α (Abb.9 E).

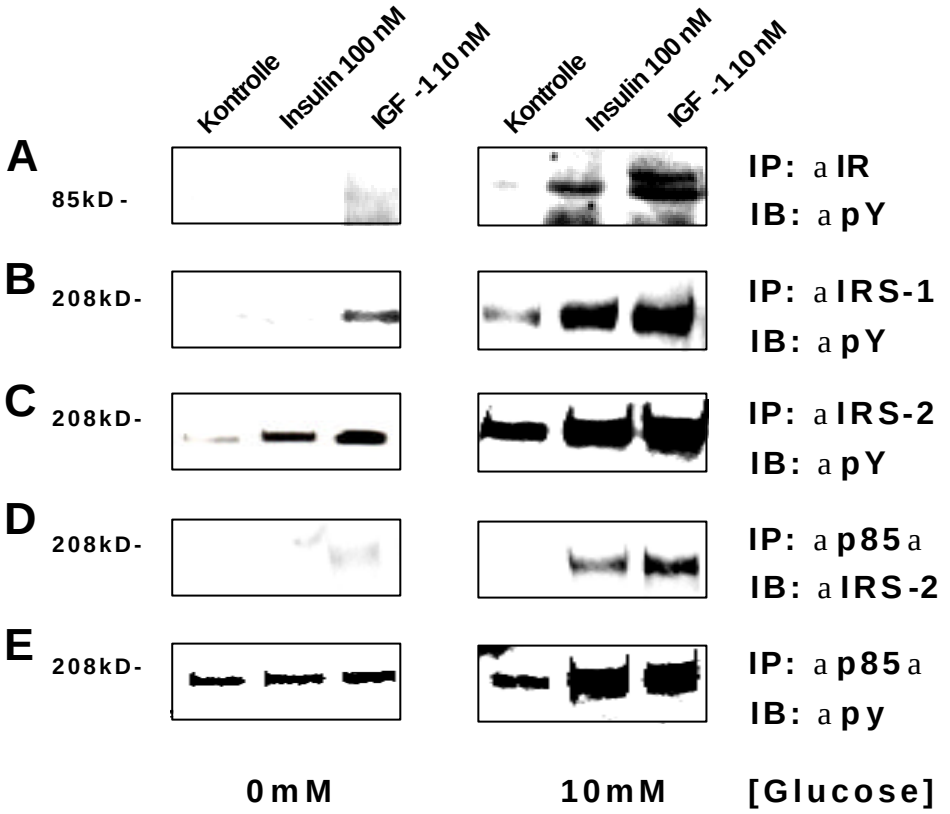

Abb. 9. Phosphorylierung von IRS-Isoformen.
Die Aktivierung der Signaltransduktionswege in INS-1 Zellen erfolgte durch Stimulation mit Insulin und IGF-1 bei 0 mM und 10 mM Glucose. INS-1 Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium inkubiert und anschließend mit 100 nM Insulin oder 10 nM IGF-1 für 10 min. stimuliert. Die Zell-Lysate wurden auf die gleiche Proteinmenge eingestellt und mit Antikörpern gegen die β-Kette des Insulinrezeptors (IR; A), gegen IRS-1 (B), IRS-2 (C) und p85α (D-E) inkubiert. Nachfolgend wurde eine SDS-PAGE und einWesterntransfer mit den Immunopräzipitaten durchgeführt. Im Anschluss daran wurde ein Immunoblot mit Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosinreste (pY; A-C, E) und IRS-2 (D) durchgeführt. Bei den abgebildeten Blots handelt es sich um repräsentative Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten.

10. Mechanismen der PKB/Akt Aktivierung in INS-1 Zellen

Der durch Insulin und IGF-1 aktivierte Signalübertragungsweg der schließlich zur Phosphorylierung der PKB/Akt führte, verlief über Tyrosinkinaserezeptoren, Bindung von IRS-Isoformen und die Aktivierung der PI3K. Um herauszufinden, ob und auf welcher Ebene die Signalwege von Insulin und IGF-1 auf der einen Seite und GLP-1 auf der anderen Seite konfluieren, wurden Tyrosinkinase- und PI3K Inhibitoren eingesetzt. Aufgrund der vorausgegangenen Experimente war bekannt, dass Insulin, IGF-1 und GLP-1 die PKB/Akt in INS-1 Zellen aktivieren. GLP-1 war in einer Konzentration von 100 nM in der Lage nach 60 min. eine Aktivierung der PKB/Akt um das 2,5fache zu induzieren, die sonst bei einer Konzentration von 10 nM erst nach 360 min. hervorgerufen wurde (nicht abgebildet). Aus diesem Grund fand die Stimulation mit GLP-1 unter diesen modifizierten Versuchsbedingungen statt. Auch Insulin wurde in einer Konzentration von 100 nM verwendet, da der Grad der PKB/Akt Phosphorylierung mit der durch 10 nM IGF-1 erreichten PKB/Akt Aktivierung besser vergleichbar war. Die Vorinkubation mit 25 µM des Tyrosinkinaserezeptor-Inhibitors Genistein führte zu einer Inhibition der PKB/Akt Phosphorylierung durch Insulin, IGF-1 und GLP-1 (Abb.10A). Auch die PI3K Inhibitoren Wortmannin (50 nM; Abb.10B) und LY294002 (25 µM; Abb.10C) hemmten die durch Insulin, IGF-1 und GLP-1 ausgelöste PKB/Akt Aktivierung.
Am Signalübertragungsweg von Insulin, IGF-1 und GLP-1 der zur PKB/Akt Phosphorylierung führt, sind folglich Tyrosinkinasen und die PI3K beteiligt.

Nachdem GLP-1 an seinen Rezeptor gebunden hat, kommt es zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase, die einen starken Anstieg des intrazellulären cAMP nach sich zieht.
In diesem Versuch war Forskolin – ein Aktivator der Adenylatcyclase – in der Lage, die durch GLP-1 erreichte Phosphorylierung der PKB/Akt zu imitieren: Wurden INS-1 Zellen mit 50 µM Forskolin behandelt, kam es zu einer leichten Zunahme der PKB/Akt Phosphorylierung mit einem Maximum nach 60 min. (Abb.10D) und einem Abfall nach 90 min. (nicht dargestellt) vergleichbar mit der durch 100 nM GLP-1 induzierbaren PKB/Akt Aktivierung. Die durch Forskolin hervorgerufene PKB/Akt Phosphorylierung konnte wiederum inhibiert werden, indem die Zellen mit 25 µM LY294002 vorbehandelt wurden (Abb.10E). Dies war ein Hinweis auf die zentrale Bedeutung der PI3K für die PKB/Akt Aktivierung durch cAMP in INS-1 Zellen.

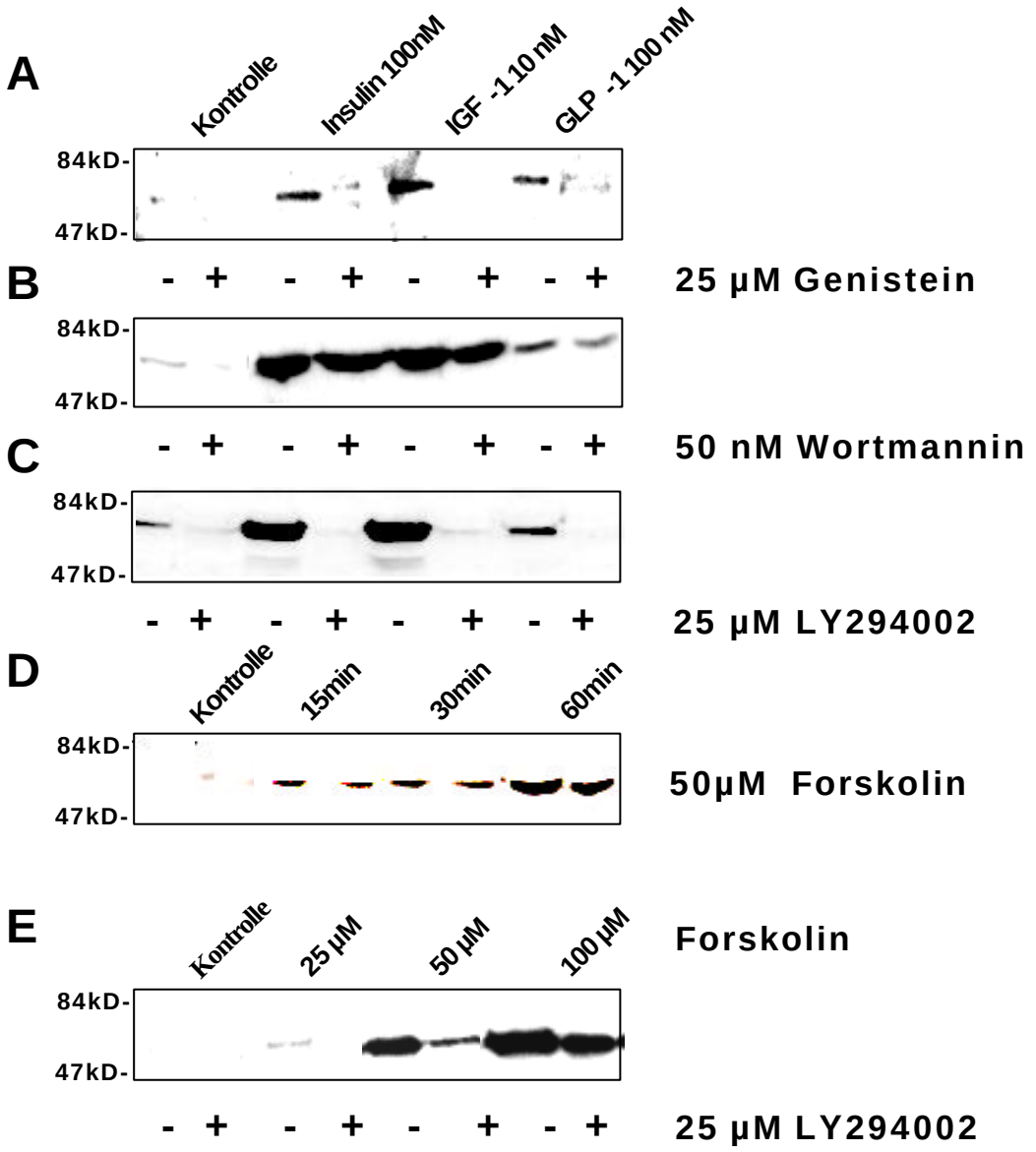

Abb. 10. Mechanismen der PKB/Akt Phosphorylierung durch Insulin, IGF-1 und GLP-1. INS-1 Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium inkubiert und mit 25 µM Genistein (A), 50 nM Wortmannin (B) or 25 µM LY294002 (C) vorbehandelt. Nachfolgend wurden die Zellen mit 100 nM Insulin für 10 min., 10 nM IGF-1 für 10 min. oder 100 nM GLP-1 für 60 min. stimuliert (A-C). D: In diesem Versuch wurden die Zellen 60 min. mit Forskolin in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und dadurch eine Phosphorylierung der PKB/Akt erzeugt. E: Mit 25 µM LY294002 vorbehandelte Zellen zeigten hingegen, dass die durch Forskolin erreichte PKB/Akt Phosphorylierung inhibiert werden konnte. Dargestellt sind in dieser Abb. repräsentative Blots aus 3 unabhängigen Experimenten.

11. Glucoseabhängigkeit der PI3K Aktivierung

Aufgrund der Schlüsselfunktion der PI3K für die Aktivierung der PKB/Akt, wurde diese Lipidkinase auf ihre Stimulierbarkeit durch Insulin, IGF-1 und GLP-1 untersucht. In den bisher durchgeführten Versuchen konnte hinsichtlich Proliferation, Apoptoserate, PKB/Akt-Phosphorylierung und Rekrutierung von IRS–Isoformen eine deutliche Glucoseabhängigkeit beobachtet werden. Daher wurde auch die Glucosewirkung auf die PI3K Aktivierung analysiert.

In der Signalkaskade der Tyrosinkinaserezeptoren folgt den IRS Proteinen und verschiedenen Adaptermolekülen die Aktivierung der Lipidkinase PI3K. In mit 100 nM Insulin, 10 nM IGF-1 und 100 nM GLP-1 über 10 min. stimulierten INS-1 Zellen bei den beiden Glucosekonzentrationen 0 mM und 10 mM, wurde die PI3K Aktivität bestimmt. Die Zellen wurden mit anti-pY und mit Antikörpern gegen die IRS-Isoformen anti-IRS-1, anti-IRS-2 und anti-Gab-1 immunopräzipitiert (Abb. 11). Als Kontrolle mit dem Wert 100% dienten glucosefrei gehaltene nicht stimulierte Zellen. Insulin und IGF-1 führten zu einem 2-3fachen Anstieg der PI3K Aktivität in den Immunopräzipitaten (Insulin: pY 182±32%; IRS-1 199±27%; IRS-2 209±47%; Gab-1 253±52%; IGF-1: pY 318±20%; IRS-1 242±10%; IRS-2 342±49%; Gab-1 161±56%; Mittelwert ±SEM aus n= 3-6). Die durch GLP-1 erreichte Aktivierung der PI3K bei 0 mM Glucose war mit den durch Insulin erreichten Werten vergleichbar. Nur in IRS-2 Immunopräzipitaten nahm die Aktivität im Vgl. zur Kontrolle ab (GLP-1: pY 154±27%; IRS-1 194±72%; IRS-2 77±6%; Gab-1 170±66%). Erhöhte man ausschließlich die Glucosekonzentration auf 10 mM - ohne Zugabe von Insulin, IGF-1 und GLP-1- ließ sich ein Aktivitätsanstieg der PI3K in anti-pY, anti IRS-1 und anti-IRS-2 Immunopräzipitaten um das 1.6 - 2fache verzeichnen. In anti-Gab-1 Präzipitaten war diese Aktivitätszunahme dagegen kaum nachweisbar (pY 208±33%; IRS-1 166±11%; IRS-2 202±38%; Gab-1 142±27). Die Stimulation mit Insulin (pY 510±2%; IRS-1 421±44%; IRS-2 557±65%; Gab-1 301±35%) und IGF-1 (pY 439±22%; IRS-1 401±12%; IRS-2 545±87%; Gab-1 248±45%) bewirkte eine 4 - 5 fache Zunahme der PI3K Aktivität im Vgl. zur Kontrolle bei 0 mM Glucose. Im Vgl. zum Kontrollwert bei 10 mM Glucose bewirkte diese Stimulation einen Aktivitätsanstieg um den Faktor 2 in pY, IRS-1 und IRS-2 Immunopräziptationen. Im Gegensatz dazu kam es in Gab-1 Immunopräzipitaten nur zu einer geringen PI3K Aktivitätszunahme. GLP-1 führte bei

0 mM Glucose zu einer 3 -4 fachen Zunahme der PI3K Aktivität in pY, IRS-1 and IRS-2 Immunopräzipitaten im Vgl. zur Kontrolle. Ein geringerer Anstieg, um das 1,5 fache des Kontrollwertes (pY 298±24%; IRS-1 246±23%; IRS-2 267±52%; Gab-1 289±41%), wurde bei einer Glucosekonzentration von 10 mM erreicht.

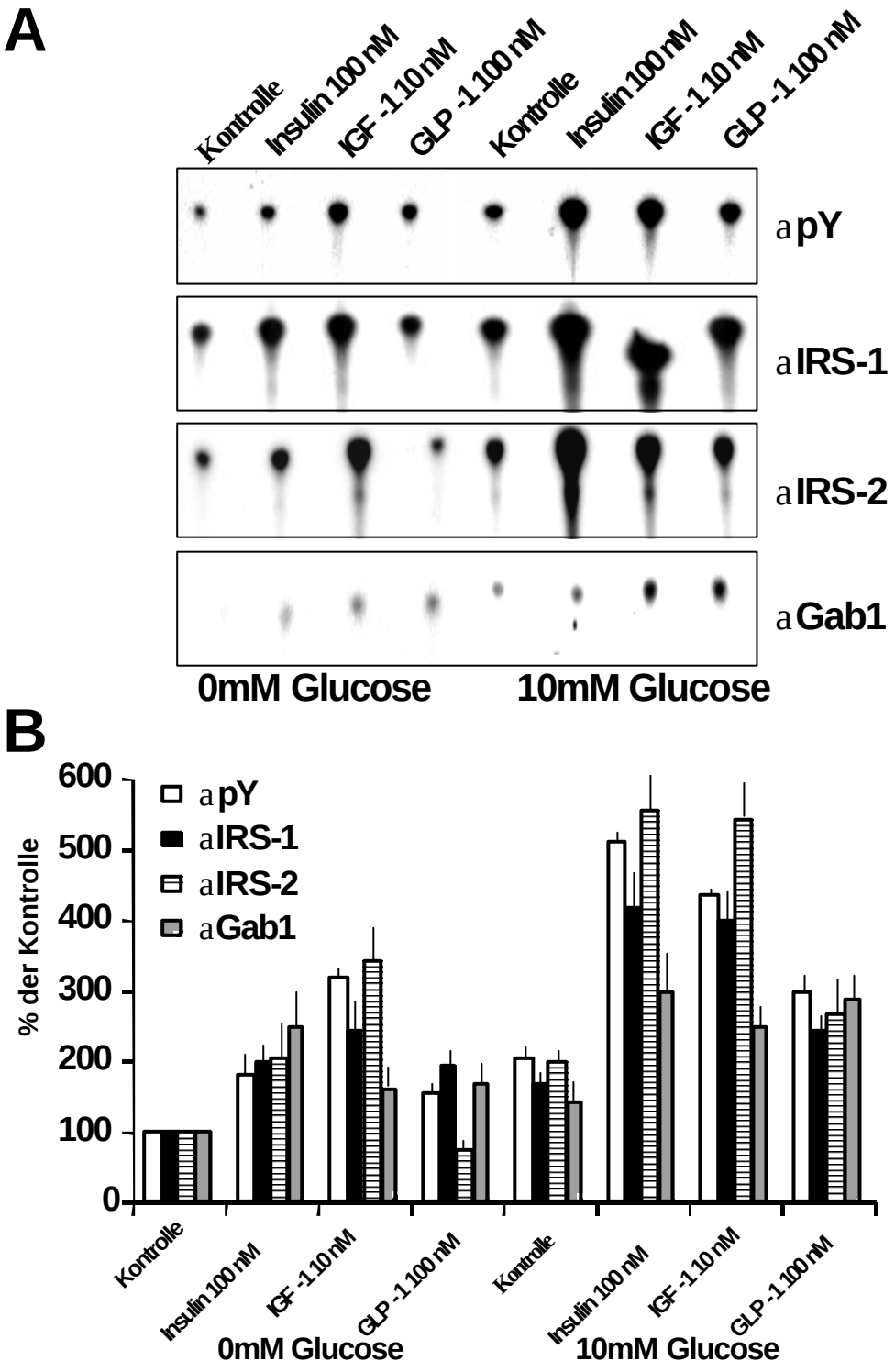

Abb. 11

12. Zeitverlauf der PI3K Aktivierung

Die Aktivität der PI3K erreichte nach Stimulation mit Insulin und IGF-1 zwischen 3 -10 min. ihr Maximum.

Aber welche Kinetik der PI3K Aktivität zeigt die GLP-1 Stimulation?

Diese Fragestellung wurde durch das folgende Experiment gelöst. INS-1 Zellen wurden zum einen mit 100 nM Insulin zum anderen mit 100 nM GLP-1 bei 10 mM Glucose für 10, 30, 60 und 90 min. stimuliert. Die Aktivität der PI3K wurde in anti-pY, anti-Insulinrezeptor (β-Kette), anti-IRS-2, anti-Gab-1 und anti-p85α Immunopräzipitaten bestimmt (Abb.12). Insulinstimulation bewirkte eine schnelle Stimulation der PI3K Aktivität in anti-pY (185±23% nach 10 min. im Vgl. zur Kontrolle; Mittelwert ±SEM; n=3-6; Abb. 12), anti-Insulinrezeptor (191±86% nach 10 min.) und anti-IRS-2 (289±71% nach 10 min.) Immunopräzipitaten. In Gab-1 Immunopräzipitaten erwies sich die durch Insulin erreichte PI3K Aktivität als insgesamt niedriger und das Maximum entwickelte sich erst nach 60 min. (184±24%). Das Stimulationsprofil in p85α Immunopräzipitaten zeigte einen biphasischen Verlauf (202±50% nach 10 min. und 218±92% nach 90 min.). Der schnellen PI3K Aktivierung durch Insulin, stand die nur allmählich ansteigende PI3K Aktivität (pY IP: 251±35% nach 60 min.) in mit GLP-1 stimulierten Zellen gegenüber. Am deutlichsten war die PI3K Aktivierung in Gab-1 (470±117% nach 60 min.) und IRS-2 (321±75% nach 60 min.) Immunopräzipitaten ausgeprägt. Im Gegensatz dazu konnte anti-Insulinrezeptor assoziierte PI3K Aktivität durch GLP-1 nicht stimuliert werden. Auch in anti-p85α -? Immunopräzipitaten verursachte die Stimulation mit GLP-1 nur einen geringgradigen Anstieg der PI3K Aktivität (Abb.12).

Text zu Abb.11. Glucoseabhängigkeit der PI3K Aktivität. Zunächst wurden INS-1 Zellen über Nacht in serumfreien Medium gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit 100 nM Insulin, 10 nM IGF-1 und 100 nM GLP-1 stimuliert und nach 10 min. geerntet. Zell-Lysate wurden mit Antikörpern gegen pY, IRS-1, IRS-2 und Gab-1 immunopräzipitiert. Im Anschluss folgten PI3K Assays. ^{32}P-Aufnahme in die Phosphatidylinositol 3-P wurde densitometrisch nachgewiesen, nachdem zuvor die Auftrennung der Lipide mittels Dünnschichtchromatographie erfolgt war. Die abgebildete Bande zeigt die Phosphatidylinositol 3-P . A : Hier sind repräsentative Röntgenfilme abgebildet; B:. Die Daten (Mittelwert ± SEM; n =3-6) werden angegeben als Verhältniswerte zur Kontrolle aus nicht stimulierten Zellen, die in glucosefreiem Medium gehalten wurden. Der Kontrollwert wird als 100% definiert.

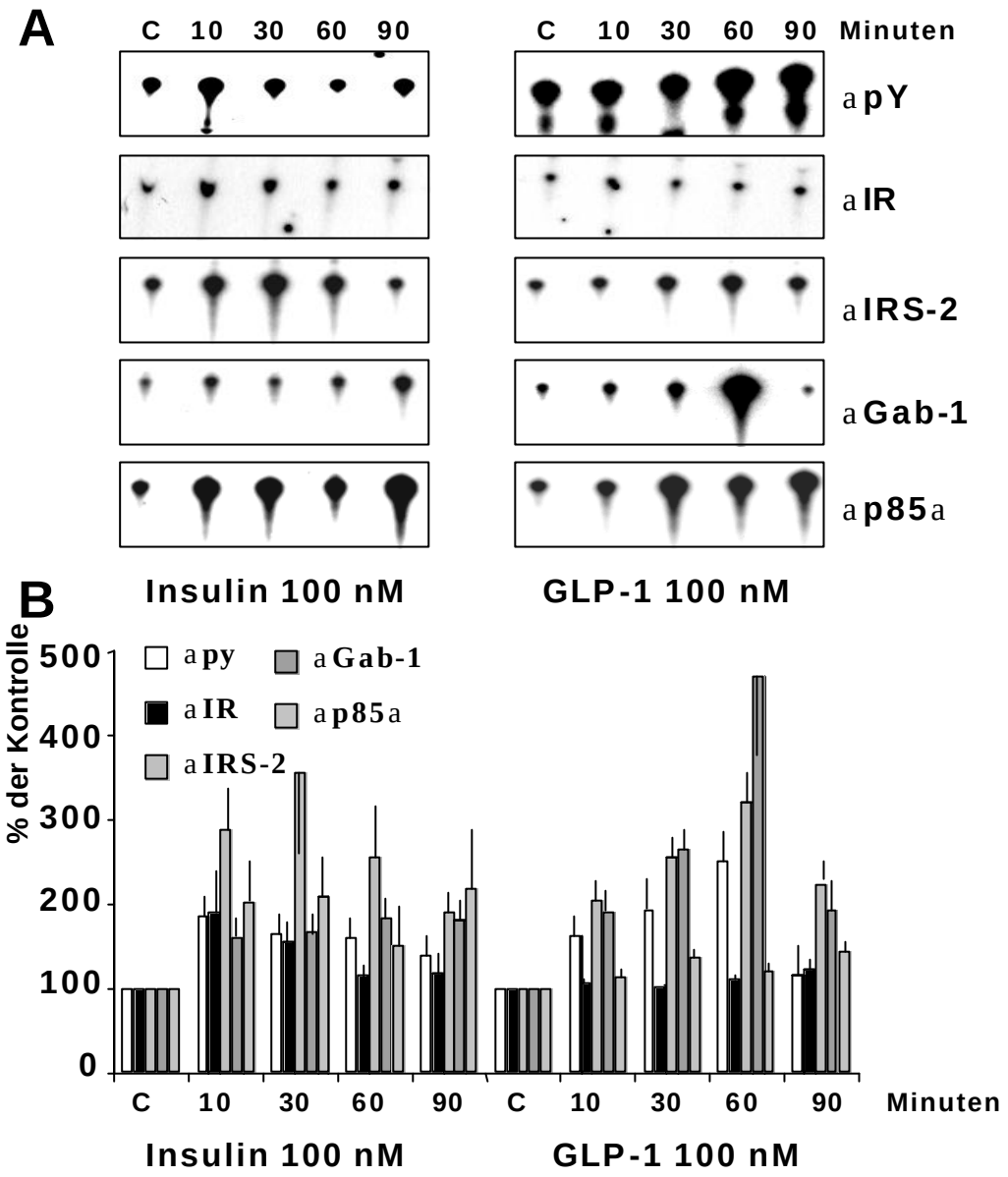

Abb. 12. Zeitverlauf der PI3K Aktivierung durch Insulin und GLP-1. INS-1 Zellen wurden über Nacht in serumfreien Medium gehalten. Am nächsten Morgen erfolgte die Stimulation mit 100 nM Insulin und 100 nM GLP-1 über einen Zeitraum von 10, 30, 60 und 90 min. Die Glucosekonzentration im Stimulationsmedium betrug 10 mM. Die Zellen wurden anschließend lysiert, die Proteinkonzentrationen zwischen den Proben angeglichen und auf gleiche Volumina eingestellt. Die nun erfolgende Immunopräzipitation der INS-1 Zellen richtete sich gegen den IR, IRS-2, Gab-1 und p85α. PI3K Assays wurden – wie im Kapitel Methoden dargelegt- durchgeführt. ^{32}P-Inkorporation in Phosphatidylinositol 3-P wurde nach der Lipidauftrennung in der Dünnschichtchromatographie anhand von Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Durch Unterschiede in der Schwärzungsintensität der Banden konnten die Ergebnisse quantifiziert werden. Die dargestellte Bande steht für Phosphatidylinositol 3-P. **A** zeigt repräsentative Filme aus drei unabhängigen Versuchen. Das Diagramm **B** repräsentiert die quantitative Auswertung dieser Experimente. Sie werden im Verhältnis zur Kontrolle ausgedrückt, die als 100% definiert ist. Die Kontrollzellen wuchsen in serumfreien Medium bei einer Glucosekonzentration von 10 mM. Sie wurden erst am Ende der Stimulationsperiode geerntet, d.h. nach 90 min.

Abbildung 13 gibt eine Zusammenfassung über die Signaltransduktionswege in INS-1 Zellen.

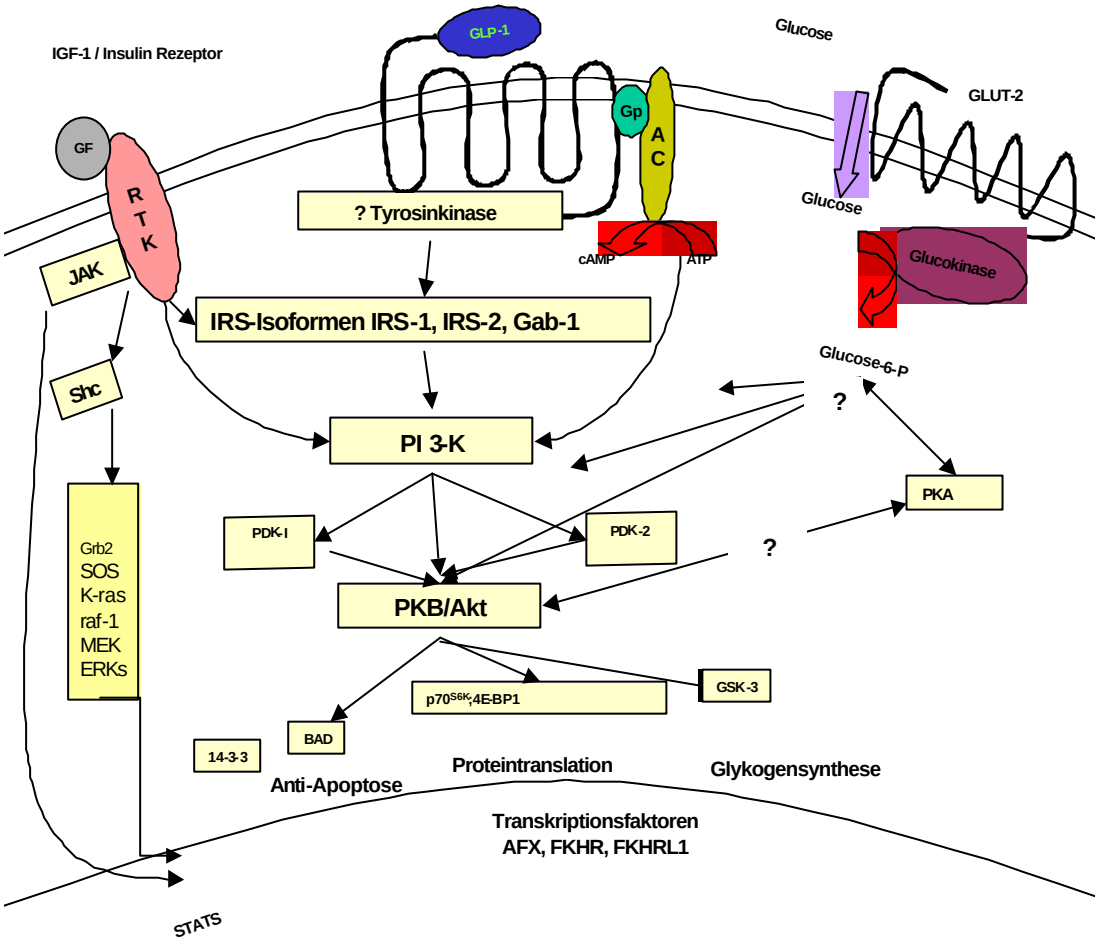

Abb. 13. Zusammenfassung des Signalübertragungsnetzes in INS-1 Zellen
Dargestellt sind die Signalwege des Insulinrezeptors, des IGF-1 Rezeptors und des GLP-1 Rezeptors in β-Zellen, die zur Aktivierung der PKB/Akt führen. Pfeile zeigen eine Aktivierung an, Balken zeigen hingegen die Hemmung eines Signalweges an und Fragezeichen stehen für unbewiesene Signalwege.
Abkürzungen: AC: Adenylat Cyclase; CaMKK: Ca++/calmodulin dependent protein kinase kinase; ERK: extracellular signal regulated kinase; Gab-1: Grb-2 associated binder-1; GF: Growth factor; Gp: G-Protein; Grb-2: Growth factor receptor bound-2; GSK-3: Glycogen-synthase kinase-3; GLP-1: glucagon-like peptide-1; GLUT2: glucose transporter 2; IGF-1, insulin-like growth factor-1; IRS: insulin receptor substrate; JAK: Janus Kinase; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MEK: MAP/ERK-Kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; p70S6K: p70 S6-kinase; PDK, phosphoinositide dependent kinase; PI3K phosphatidylinositol 3-kinase; PKA: cAMP-dependent protein kinase; PKB/Akt: protein kinase B/c-Akt; PKC: protein kinase C; RTK: receptor tyrosine kinase; SOS: son of sevenless

D Diskussion

1. Medizinische Bedeutung von Wachstumsfaktoren für b-Zellen

Der Diabetes mellitus hat das Ausmaß einer Volkskrankheit, die für den Patienten eine Belastung mit Einschränkung der Lebensqualität darstellt und deren medizinische Behandlung für die Gesellschaft hohe Kosten verursacht. In den westlichen Ländern leidet ein Bevölkerungsanteil von ungefähr 6% an Diabetes mellitus und seinen Komplikationen (Harris et al. 1987). Der Diabetes mellitus Typ II, der über 90% der Diabetiker betrifft, wird häufig durch die gleichzeitig bestehende Adipositas klinisch manifest oder verschlechtert. So ist der erste Therapieansatz bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ II eine nicht medikamentöse Therapie mit entsprechender Diabetesdiät und Patientenschulung (Berger M 2000). Wird das Therapieziel nicht erreicht, steht an zweiter Stelle eine individuell angepasste medikamentöse Behandlung. Zur Verfügung stehen Insulin, die oralen Antidiabetika und eine Kombinationstherapie aus beiden. Durch die exogene Insulinzufuhr wird der Mangel an körpereigenem Insulin substituiert. Orale Antidiabetika verbessern die Insulinwirkung in insulinabhängigen Geweben (Metformin, Thiazolidine), verzögern die postprandiale intestinale Kohlenhydratresorption (Acarbose) und führen zu einer gesteigerten Insulinsekretion der β-Zelle (Sulfonylharnstoffe). Die medikamentöse Behandlung ist keine „Heilung“ und kann eine Progression des Diabetes mellitus oft nicht verhindern. Sie besitzt Nebenwirkungen, kann eine Insulinresistenz verstärken und eine Erschöpfung der β-Zellen beschleunigen. Daher geht die Suche nach effektiveren Medikamenten zur Behandlung des Diabetes mellitus weiter (Rachman J 1995; Wolffenbuttel HR 1996; b Nauck M 1996). Die Therapie konzentriert sich zur Zeit vor allem auf die Überwindung der peripheren Insulinresistenz. Forschungsergebnisse, u.a. an transgenen Mäusen gewonnen, zeigen aber, dass neben der peripheren Insulinresistenz ebenso Änderungen der β-Zellmasse für die Entstehung des Diabetes mellitus Typ II verantwortlich sind. So wird die klinische Manifestation des Diabetes mellitus Typ II durch eine in Bezug auf das Körpergewicht und den Insulinbedarf verhältnismäßige Reduktion der β-Zellmasse und die dadurch fehlende kompensatorische Hyperinsulinämie bei vorhandener peripherer Insulinresistenz verursacht. Einem neuen Therapiekonzept mit β-zellspezifischen Wachstumsfaktoren, welche eine Verringerung der β-Zellmasse verhindern könnten, käme eine große Bedeutung zu.

2. Wachstumsfaktoren für b-Zellen

Die insulinsezernierenden β-Zellen aus den Langerhansschen Inseln des Pankreas sind hochspezialisierte Zellen mit einer nur geringen Teilungsrate. Die β-Zellmasse passt sich dem Insulinbedarf des Organismus an. Diese Plastizität wird durch β-Zellproliferation, β-Zellneogenese und auf der anderen Seite durch die Apoptose von β-Zellen erreicht (a, b Bonner-Weir S 2000; a Nielsen JH et al. 1999). Bisher wurden verschiedene Hormone und Stoffwechselmetaboliten als Wachstumsfaktoren für β-Zellen identifiziert (b Nielsen JH et al. 2001). Zu diesen gehören IGF-1 und Glucose. Auch das Glucoinkretinhormon GLP-1 wurde als Wachstumsfaktor und Differenzierungsfaktor für β-Zellen charakterisiert. Dies konnte im Tiermodell, an isolierten Inselzellen und in klonalen β-Zellen gezeigt werden (Gang X et al 1999, Zhou J et al. 1999, a Buteau J et al. 1999). Transgene Mäuse mit einer β-zellspezifischen Nullmutation des Insulinrezeptors entwickeln einen diabetischen Phänotyp, der durch einen insulinsekretorischen Defekt und eine geringgradige Inselzellhypoplasie entsteht (Kulkarni RN et al. 1999). Dies ist ein Hinweis auf die autokrine, mitogene Insulinwirkung auf β-Zellen. Wachstumsfaktoren induzieren allgemein über ihre intrazellulären Signalkaskaden Zellproliferation und unterbrechen apoptotische Signalwege.

3. Signaltransduktionsmodule in b-Zellen

Die PKB/Akt ist ein wichtiges Signaltransduktionsmodul von mitogenen und anti-apoptotischen Signalübertragungswegen. Die Lipidkinase PI3K ist der PKB/Akt als Hauptaktivator vorgeschaltet. Die PI3K erreicht diesen stimulatorischen Effekt entweder direkt durch die Bindung phosphorylierter Phosphatidylinositole an die PH-Domäne der PKB/Akt, oder effizienter über die zwischen geschaltete Aktivierung der PDK-1 und PDK-2 (Coffer PJ et al. 1998, Leevers SJ et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde der PI3K/PKB Signalweg als ein wichtiger mitogener Signaltransduktionsweg in INS-1 Zellen untersucht. Signalübertragungswege, die zur Aktivierung der PKB/Akt führen, laufen auch über die PKA (Filippa N et al. 1999), die

CaM-KK (Yano S et al. 1998) und PI3Kγ, welche durch Bindung an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor aktiviert wird (Murga C et al. 1998).
Weiterhin sind diese Signalwege keine „Einbahnstraßen“, sondern es existieren verschiedene Rückkopplungsmechanismen. So bestehen Hinweise darauf, dass die PKB/Akt im aktivierten Zustand in der Lage ist IRS-1 durch Serin-Phosphorylierung zu inaktivieren. Dadurch wird die Aktivität des Insulinsignals reduziert oder abgeschaltet (Li J et al. 1999). Mittlerweile ist auch bekannt, dass die PKB/Akt nicht nur an Threonin- und Serinresten phosphoryliert wird, sondern es kann auch eine Tyrosin-Phosphorylierung stattfinden. Welche Auswirkung dies auf den Aktivitätsgrad der PKB/Akt hat und welche Tyrosinkinase für diese Phosphorylierung verantwortlich ist, bleibt zu untersuchen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei der Tyrosinkinase um ein Mitglied der src-Familie, welche zu den rezeptorlosen Tyrosinkinasen zählen (Chen R et al. 2001).

4. Proliferation und Apoptose in INS-1 Zellen

Glucose ist ein gut charakterisierter Wachstumsfaktor für ? -Zellen. Die Messung der Proliferationsfrequenz in INS-1 Zellen im BrdU Assay (siehe Kapitel Methoden) bestätigte die mitogene Wirkung von Glucose. Die durch Glucose induzierte Proliferationsrate war bei Konzentrationen zwischen 10 mM und 15 mM am höchsten. So wurde bei einer Glucosekonzentration von 15 mM eine 6-7 fache Steigerung der Proliferationsrate im BrdU-Assay erreicht. Cousin et al., die ebenfalls die Wirkung von Glucose auf die Proliferationsrate von INS-1 Zellen untersuchten, ermittelten höhere Werte. Bei einer Glucosekonzentration von 15 mM erhielten sie eine Steigerung der Proliferationsrate um den Faktor 20. Möglicherweise sind diese Abweichungen durch unterschiedliche Versuchsanordnungen zu erklären. So wurde die DNA Synthese und INS-1 Zellproliferation von Cousin et al. im [^{3}H] Thymidin Inkorporationsassay gemessen (Cousin SP et al. 1999), der möglicherweise einen geringeren Basalwert bedingt, sodass im Vergleich zum BrdU-Assay die Steigerung der Proliferationsrate höher ausfällt. Übereinstimmend wurde hingegen festgestellt, dass Werte unter 10 mM und über 15 mM Glucose im Medium zu einer geringeren Proliferationsrate führten. Auch die Hormone Insulin, IGF-1 und GLP-1 entfalteten ab einer Glucosekonzentration von 5-10 mM im Stimulationsmedium eine proliferationsfördernde Wirkung. Diese Wachstumsfrequenz war bei höheren Glucosekonzentrationen (> 15 mM) wieder

rückläufig. War keine Glucose im Medium vorhanden, riefen Insulin, IGF-1 und GLP-1 keinen Effekt hervor.

Zusätzlich zu der mitogenen Wirkung von Glucose konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Glucose ab einer Konzentration von 5-10 mM eine anti-apoptotische Wirkung entfaltet. Glucosekonzentrationen über 10 mM führten zu einer geringen weiteren Absenkung der Apoptosefrequenz. Die Versuchsergebnisse der vorliegenden Arbeit werden unterstützt durch Experimente von Hoorens A et al. an endogenen ? -Zellen von Wistar Ratten. Sie konnten zeigen, dass mit steigenden Glucosekonzentrationen von 3 –10 mM der Anteil der apoptotischen ? -Zellen reduziert wurde. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit stellten sie fest, das eine weitere Steigerung der Glucosekonzentration im Medium von 10 mM auf 20 mM den Anteil der apoptotischen Zellen nicht wesentlich veränderte (Hoorens A et al. 1996). Die anti-apoptotische Wirkung von Glucose wurde auch von Efanova IB et al. an endogenen b-Zellen von ob/ob Mäusen sowie Wistar Ratten untersucht. Ab Glucosekonzentrationen über 11 mM stellten sie jedoch im Gegensatz zu diesen Versuchsergebnissen eine erneute Zunahme der Apoptosefrequenz fest (Efanova IB et al. 1998). Die Messung der Apoptoserate erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch Messung der histon-assoziierten DNA-Fragmente mittels ELISA, Hoorens et al. ermittelten apoptotische Zellen elektronenmikroskopisch oder fluoreszenz-mikroskopisch. Efanova et al. ermittelten die Apoptoserate mittels „DNA-laddering“ und der TUNEL („*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling*“)-Methode. Da die Arbeitsgruppen neben unterschiedlichen Zielzellen auch unterschiedliche Methoden zur Messung der Apoptoserate verwendeten, könnte darin die Ursache für die differierenden Versuchsergebnisse liegen.

Die anti-apoptotische Wirkung von Insulin, IGF-1 und GLP-1 ist glucoseabhängig. Nach Stimulation mit Insulin, IGF-1 und GLP-1 konnte die Apoptosefrequenz am effektivsten bei Glucosekonzentrationen von 5-10 mM gesenkt werden. Bei höheren oder niedrigeren Glucosekonzentrationen fiel die Inhibition der Apoptose durch Insulin, IGF-1 und GLP-1 geringer aus.

Die an β-Zellen der Ratte ermittelten Daten unterscheiden sich von Ergebnissen, die an humanen β-Zellen gewonnen wurden. Maedler K et al. untersuchten die Wirkung erhöhter Glucosekonzentrationen auf Zellproliferation und Apoptose an humanen β-Zellen. Bereits bei einer Glucosekonzentration von 11,1 mM kam es im Vgl. zu einer

Glucosekonzentration von 5,5 mM zu einer Reduktion der Proliferationsrate um 42%. Bei 11,1 mM Glucose beobachteten Maedler et al. eine Erhöhung der DNA-Fragmentation in der TUNEL-Technik als sicheres Zeichen einer erhöhten Apoptoserate. Als mögliche Erklärung der entgegengesetzten Wirkung erhöhter Glucosespiegel - auf der einen Seite apoptotisch in menschlichen β-Zellen und auf der anderen Seite anti-apoptotisch in β-Zellen der Ratte – bieten Maedler et al. an, dass auf humanen β-Zellen im Gegensatz zu β-Zellen der Ratte das FasLigand Protein konstitutiv exprimiert wird. Über die glucoseinduzierte vermehrte Expression des Fas-Rezeptors könnte ein Apoptoseweg angeschaltet werden (Maedler K et al. 2001).

5. PKB/Akt Phosphorylierung in INS-1 Zellen

Die PKB/Akt Phosphorylierung und - wie im Serinkinaseassay gezeigt werden konnte - auch die PKB/Akt Aktivität nahmen mit steigenden Glucosekonzentrationen zu. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einer kürzlich publizierten Arbeit, in der eine PKB/Akt Phosphorylierung durch Glucose nicht festgestellt werden konnte. Dickson LM et al. vertraten die Ansicht, dass die glucoseabhängige β-Zellproliferation nicht über eine Aktivierung des „phosphoinositide-dependent-kinase-1“ (PDK-1)/PKB Signalmoduls erfolgen würde, sondern hauptsächlich über die Serinkinase „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) und die p70S6K vermittelt würde (Dickson LM et al. 2001). Die Ursache dieser entgegengesetzten Ergebnisse liegt wahrscheinlich in unterschiedlichen Stimulationszeiten mit Glucose. In dieser Arbeit wurden Stimulationszeiten von 12 – 16 Stunden gewählt. Dem gegenüber wurden von Dickson LM et al. kurze Stimulationszeiten gewählt (maximal 40 Minuten). Wenn die glucoseabhängigen PKB/Akt Aktivierung nach einer langsamen Kinetik verläuft, könnte die PKB/Akt nach einer Stimulationszeit von 40 min. noch nicht aktiviert worden sein.

Eine PKB/Akt Aktivierung durch eine glucoseinduzierte Insulinsekretion der INS-1 Zellen nach einer Stimulationszeit von 12 - 16 Stunden kann nicht ganz ausgeschlossen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass trotz der Vorbehandlung der INS-1 Zellen mit den Inhibitoren KN 93 und KN 62, die über Hemmung von CAMK Isoformen eine Insulinsekretion der β-Zelle verhindern, eine PKB/Akt Phosphorylierung nach Glucosestimulation detektierbar war (Trümper A et al. in

Vorbereitung). Der Inhibitor KN 62 hemmt die CAMK-Isoformen CAMKI/IV und CAMKII. KN 93 ist ein selektiverer Inhibitor der CAMKII (Niki et al 1993, Marley und Thomson 1996). Da Insulin, IGF-1 und GLP-1 glucoseabhängig als Wachstums- und Antiapoptosefaktoren für β-Zellen dienen, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass in den von ihnen induzierten Signalkaskaden die PKB/Akt involviert ist. Die beste Korrelation von Zellproliferation und PKB/Akt Phosphorylierung konnte bei Glucosekonzentrationen zwischen 5-10 mM erreicht werden. Bei einem niedrigeren Glucosespiegel wurde durch Insulin, IGF-1 und GLP-1 nur ein geringes INS-1 Zellwachstum ausgelöst. Auch die Apoptoserate der INS-1 Zellen wurde bei Glucosekonzentrationen unter 5 mM nicht signifikant verringert. Die PKB/Akt lag hingegen schon im phosphorylierten Zustand vor. Bei Glucosekonzentrationen über 10 mM konnte nach Stimulation mit Insulin, IGF-1 und GLP-1 eine Zunahme der PKB/Akt Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Abweichungen von diesen Versuchsergebnissen finden sich in den Untersuchungen von Buteau et al. Diese Arbeitsgruppe postulierte, dass sowohl Glucose als auch GLP-1 die PKB/Akt aktivieren, aber dass Glucose und GLP-1 nicht additiv wirken. Buteau et al. konnten eine durch GLP-1 ausgelöste PKB/Akt Aktivität und eine Steigerung der Zellproliferation bereits bei Glucosekonzentrationen von 3 mM nachweisen. In Widerspruch zu den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen führte die Stimulation mit GLP-1 bei einer Glucosekonzentration von 11 mM zu keiner weiteren Zunahme der PKB/Akt Phosphorylierung (b Buteau et al. 2001). Diese differierenden Ergebnisse sind auf Unterschiede zwischen den Stimulationszeiten zurückzuführen. In den Experimenten dieser Arbeit wurden die INS-1 Zellen über nacht in den entsprechenden Glucosekonzentrationen äquilibriert. Buteau et al. stimulierten 24 h mit Glucose und GLP-1. Bei diesen langen Stimulationszeiten konnte auch in dieser Arbeit keine additive Wirkung von Glucose und GLP-1 auf die PKB/Akt Phosphorylierung nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass additive Wirkungen wesentlich vom Versuchsaufbau abhängen könnten.

Insulin, IGF-1 und GLP-1 zeigten eine differente zeit-, dosis- und glucoseabhängige PKB/Akt Phosphorylierung und Aktivierung. Die über den Insulinrezeptor und IGF-1 Rezeptor vermittelte PKB/Akt Aktivierung verläuft schnell – im Bereich von wenigen Minuten. Nach Insulinstimulation mit 10 nM war bereits nach 3 min., nach IGF-1 Stimulation mit 10 nM war nach 20 min. die maximale PKB/Akt Phosphorylierung

erreicht. Die PKB/Akt Phosphorylierung nach GLP-1 Stimulation zeigte eine andere Kinetik. Bei einer Konzentration von 10 nM GLP-1 war erst nach 360 min. eine allmähliche Zunahme der PKB/Akt Phosphorylierung nachweisbar. Bei diesem Versuch musste ausgeschlossen werden, dass die PKB/Akt Phosphorylierung nach GLP-1 Stimulation durch von den INS-1 Zellen sezerniertes Insulin zustande kommt. Die β-Zellen weisen GLP-1 Rezeptoren auf. Die Aktivierung der GLP-1 Rezeptoren ruft einen Anstieg an intracytoplasmatischem cAMP hervor. Weiterhin kommt es zu einem Schließen der ATP-sensitiven Kaliumkanäle, der Aktivierung von Ryanodin Rezeptoren und dadurch zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration bei erhöhten Glucosespiegeln ermöglicht schließlich die Insulinsekretion (Fehmann HC et al. 1995, Salapek AM et al. 1999, Holz GG et al. 1999).

Die nach GLP-1 Stimulation erreichte PKB/Akt Phosphorylierung ist jedoch spezifisch und wird nicht durch Insulin erreicht. Dies wird bei der Betrachtung der an der GLP-1 Signalübertragung beteiligten Signalmodule deutlich. Der durch GLP-1 über seinen G-Protein gekoppelten Rezeptor angesteuerte Signalübertragungsweg differiert von dem durch Insulin und IGF-1 über einen Tyrosinkinaserezeptor verlaufenden Signalweg (White MF 1998, Virkamäki A et al. 1999).

Im Verhältnis zu der durch IGF-1 im Dosis-Wirkungsprofil erreichten PKB/Akt Phosphorylierung, erzielen Insulin und GLP-1 eine viel geringere PKB/Akt Phosphorylierung. Damit stellt sich die Frage, ob diese beiden Hormone trotzdem für die β-Zellproliferation von biologischer Bedeutung sind. Um eine Antwort zu finden, muss beachtet werden, dass Insulin und GLP-1 durch β- und α-Zellen im Inselorgan sezerniert werden und ihre Wirkung direkt vor Ort entfalten könnten (Aspinwall CA et al. 1999, Fehmann HC et al. 1995). Durch diese parakrine oder sogar autokrine Stimulation der β-Zellen durch Insulin und GLP-1 kann der Wirkungsgrad stärker sein, als der des im Blut zirkulierenden IGF-1. So könnte die proliferative Wirkung von Insulin auf β-Zellen über die Aktivierung des anti-apoptotischen Signalmoduls PKB/Akt einige Effekte in β-zell-spezifischen Insulinrezeptor-Nullmutationsmäusen erklären (Kulkarni RN et al. 1999).

6. Molekulare Wirkung von Insulin, IGF-1 und GLP-1 in INS-1 Zellen

Durch den Tyrosinkinaseinhibitor Genistein und den PI3K-Inhibitor Wortmannin konnte die durch Insulin, GLP-1 und IGF-1 erreichte PKB/Akt Phosphorylierung gehemmt werden. Dies weist auf die Beteiligung einer Tyrosinkinase an der GLP-1 induzierten Signalübertragung hin. Ebenso ist es ein Hinweis, auf eine Verbindung der beiden Signalwege. In den durchgeführten Experimenten (sowohl in den Immunopräzipitationen, als auch in den PI3K Assays) konnte eine Aktivierung des Insulinrezeptors durch GLP-1 nicht nachgewiesen werden. Dennoch kann eine Phosphorylierung des Insulinrezeptors anhand dieser Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, da möglicherweise die Nachweismethoden zur Detektion einer Phosphorylierung des Insulinrezeptors zu wenig sensitiv sind. Die transiente Aktivierung des Insulinrezeptors durch unterschiedliche Liganden oder intrazelluläre Signalmoleküle könnte eine zentrale Rolle für die Funktion der β- Zelle spielen. So wird der Insulinrezeptor in Anwesenheit von Glucose phosphoryliert (Velloso LA et al. 1995, Rothenberg PL et al. 1995). Natürlich besteht die Möglichkeit das abgesehen vom Insulinrezeptor auch andere Tyrosinkinasen an der Signalübertragung von GLP-1 zur PKB/Akt beteiligt sind. Wurden INS-1 Zellen stabil mit dem GLP-1 Rezeptor transfiziert, konnten viele tyrosinphosphorylierte Banden nachgewiesen werden, welche mit dem aktivierten GLP-1 Rezeptor verbunden waren.

Bei einer dieser Banden lassen die Versuchsergebnisse vermuten, dass es sich um ein Mitglied der src-Familie handelt (Della Rocca GJ et al. 1999). Die Mitglieder der src-Familie gehören zu den Tyrosinkinasen, sind aber nicht an einen Rezeptor gekoppelt. Es konnte bereits der Beweis erbracht werden, dass Tyrosinkinasen der src-Familie direkte Effektoren von bestimmten G-Protein Isoformen darstellen und damit in den Signalweg von G-Protein gekoppelten Rezeptoren eingebettet sind. Das mit dem GLP-1 Rezeptor assoziierte Gα_iProtein gehört zu den G-Protein Isoformen, die src aktivieren könnten (Ma YC et al. 2000).

Bei den durchgeführten PI-3K Assays konnte in Immunopräzipitaten von IRS-Isoformen nach GLP-1 Stimulation eine Aktivierung der PI3K nachgewiesen werden. Bei einer Stimulationszeit von 10 Minuten fiel das Ergebnis für IRS-1 und IRS-2 relativ schwach aus, aber in Gab-1 Immunopräzipitaten konnte eine erhöhte PI3K Aktivität nachgewiesen werden. Von diesen Versuchsergebnissen angeleitet, wurden die durch GLP-1 induzierten Effekte bei 90 Minuten erneut untersucht und mit den durch Insulin

induzierbaren Veränderungen der PI3K Aktivität verglichen. Die höchste PI3K Aktivität nach GLP-1 Stimulation zeigten die IRS-Isoformen IRS-2 und Gab-1, die folglich hauptsächlich in der Signalübertragung in β-Zellen durch GLP-1 involviert sind. Die Tyrosinphosphorylierung von IRS-2 und Gab-1 durch GLP-1, welche in den Immunopräzipitaten nachweisbar ist, zeigt einen ähnlichen Zeitverlauf, wie die PI3K Aktivierung durch GLP-1.

Über Gab-1 sowie IRS-2 und möglicherweise über IRS-1 ist darüber hinaus eine Aktivierung des MAPK Signaltransduktionsweges möglich (Daub H et al. 1997). Dies wird vermittelt durch eine Aktivierung des EGF Tyrosinkinaserezeptors über die Bindung an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Der MAPK Signalweg wird durch Tyrosinkinaserezeptoren unter Mitwirkung der Adapterproteine Grb-2 und Shc aktiviert. Das Signal wird über die GTPase raf, die Serin/Threoninkinase ras, die MAPKK MEK 1/2 auf die MAPK ERK 1/2 übergeleitet. Der nukleäre Effektor der MAPK ERK 1/2 ist der Transkriptionsfaktor elk-1 (Kolch 2000, Wilkinson et al. 2000). Die Aktivierung der PI3K durch Gab-1 sowie IRS-2 könnte auf zwei Wegen erfolgen. Entweder direkt über die Bindung an die p85α Untereinheit der PI3K (Holgado-Madruga M et al. 1996), oder indirekt über eine bisher noch unbekannte Tyrosinkinase (Daub H et al. 1997).

Während die maximale durch GLP-1 induzierte PI3K Aktivität in Gab-1 Immunopräzipitaten 4,5fach erhöht war, fiel die Aktivierung der PI3K in p85α Immunopräzipitaten deutlich niedriger aus. Diese durch GLP-1 erreichbaren unterschiedlichen Aktivierungsmuster der PI3K lassen an die Beteiligung anderer PI3K Isoformen statt der p85α am GLP-1 Signalübertragungsweg denken. Dies erscheint umso wahrscheinlicher, betrachtet man die Vielzahl der bekannten Isoformen. Allein die Isoformen der regulatorischen Untereinheiten der IA PI3K Klasse existieren aufgrund der Transkription unterschiedlicher Gene in drei verschiedenen Isoformen. Durch alternatives Spleißen und einen unterschiedlichen Transkriptionsbeginn erhält man eine Anzahl von neun unterschiedlichen regulatorischen Untereinheiten der PI3K Klasse IA (Xia X et al. 1999, White MF et al. 1998, Virkamäki A et al. 1999, Leevers SJ et al. 1999). Die Kombination dieser regulatorischen mit einer der drei verschiedenen katalytischen Untereinheiten (Leevers SJ et al. 1999), ergibt vielseitige Interaktionsmöglichkeiten der PI3K Untereinheiten, über die auch eine GLP-1 Stimulation eine Aktivierung der PKB/Akt nach sich ziehen könnte. Ebenso könnte auch eine andere PI3K Isoform, die katalytische Untereinheit p110γ?an der PKB/Akt

Phosphorylierung beteiligt sein, denn diese Isoform bindet an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Bondeva T et al. 1998, Murga C et al. 1998).

7. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in INS-1 Zellen Insulin, IGF-1 und GLP-1 über die Stimulation ihrer spezifischen Signaltransduktionswege als glucoseabhängige Wachstums- und Antiapoptosefaktoren wirken. Insulin, IGF-1 und GLP-1 vermitteln ihre proliferative und anti-apoptotische Wirkung über eine differierende PKB/Akt Aktivierung.

Substanzen, welche die β-Zellfunktion und Proliferation über Aktivierung der PKB/Akt steigern, wären ein neues Therapiekonzept zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ II. Liganden der Tyrosinkinaserezeptoren, wie Wachstumshormon und IGF-1 scheinen bei flüchtiger Betrachtung zunächst erfolgsversprechend zu sein, denn sie führen zu einer starken β-Zellproliferation (Hügl SR et al. 1998, a Buteau J et al. 1999, Scharfmann R et al. 1996). Sie eignen sich jedoch nicht zur Diabetesbehandlung, da eine solche Therapie aufgrund der Rezeptordistribution von Tyrosinkinaserezeptoren zu nebenwirkungsreich wäre. G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind im Gegensatz dazu auf β–Zellen stark exprimiert und könnten einen selektiveren Signalweg zur Aktivierung der PKB/Akt darstellen. Das Glukoinkretinhormon GLP-1 scheint für die Behandlung des Diabetes mellitus Typ II vielversprechend zu sein. GLP-1 induziert glucoseabhängig sowohl die Sekretion als auch die Synthese von Insulin. GLP-1 senkt zudem die Glukagonkonzentration im Blut, verlangsamt die Magenmotilität und reduziert die Nahrungsaufnahme. Diese für die Therapie des Diabetes mellitus Typ II wertvollen Eigenschaften werden allerdings durch die kurze Halbwertszeit von GLP-1 im Blut geschmälert. Die Halbwertszeit beträgt in vivo nur 1-2 min. (b Kieffer TJ et al. 1995). Aus diesem Grund wird nach länger wirksamen GLP-1 Analoga gesucht.

Da die Daten alle durch Versuche an INS-1 Zellen gewonnen wurden, sind sie nur bedingt auf den Menschen übertragbar, denn einerseits handelt es sich bei INS-1 Zellen um Tumorzellen und andererseits stammen sie aus dem Rattenpankreas. Ihre Gültigkeit muss in anderen Zell-Linien überprüft werden, u.a. an humanen Inselzellen, was allerdings sehr aufwendig ist. Die ermittelten Daten über die Signalwege von Insulin, IGF-1 und GLP-1 in INS-1 Zellen können aber als Vergleichswerte für andere Hormone und Substanzen, beispielsweise das noch vor GLP-1 charakterisierte Inkretinhormon

„glucosedependend insulinotropic peptide“ (glucoseabhängiges insulinotropes Peptid/GIP) und in Frage kommende GLP-1 Analoga, herangezogen werden.

Bereits zum jetzigen Zeitpunkt findet GLP-1 als Therapeutikum in klinischen Phase II Studien Anwendung. In einigen Jahren wird eine Aussage über die Langzeitwirkung von GLP-1 auf die β-Zellen getroffen werden können.

E Zusammenfassung

Der PI3K / PKB Weg vermittelt proliferative und antiapoptotische Signale. Insulin, „Insulin-like growth factor-1“ (IGF-1) und „glucagon-like peptide-1“ (GLP-1) stellen Wachstumsfaktoren für insulinsezernierende β-Zellen dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Signaltransduktionswege und Aktivierungsmuster des PI3K/ PKB Signalmoduls durch Stimulation mit Insulin, IGF-1 und GLP-1 in der β-Zell-Linie INS-1 untersucht. Die Proliferationsrate der INS-1 Zellen steigt bei erhöhten Glucosespiegeln an. Die Apoptoserate sinkt unter erhöhten Glucosekonzentrationen ab. Die PKB/Akt wird durch 10 nM Insulin und 10 nM IGF-1 bei 10 mM Glucose schnell phosphoryliert. Die Aktivierung der PKB/Akt durch 10 nM GLP-1 bei 10 mM Glucose erfolgt um einiges langsamer. Die Aktivierung der PI3K durch Insulin und IGF-1 ist vor allem mit „Insulin Rezeptor Substrat“ (IRS) Isoformen IRS-1 und IRS-2 assoziiert. Diese Assoziation besteht weniger bei der IRS-Isoform Grb-2 binder-1 (Gab-1). Im Gegensatz dazu findet man in Gab-1 und IRS-2 Immunopräzipitaten eine PI3K Aktivierung nach Stimulation mit GLP-1, allerdings mit einem anderen Zeitverlauf.

Die Signalübertragungswege für Insulin, IGF-1 und GLP-1 in INS-1 Zellen laufen folglich auf der Ebene der IRS-Isoformen zusammen, weisen aber unterschiedliche Aktivierungsmuster hinsichtlich Zeit und Dosis auf. Daraus resultiert eine unterschiedliche Aktivierung der PI3K und der PKB/Akt. Auf Ebene der PKB/Akt laufen verschiedene proliferative und anti-apoptotische Signalwege zusammen. Die PKB/Akt kann neben der Aktivierung durch die PI3K auch unabhängig von dieser aktiviert werden. Die PKB/Akt dient als Schaltstelle für proliferative und anti-apoptotischen Signalwege der β-Zelle.

Die selektive Aktivierung der PKB/Akt in β-Zellen und die dadurch hervorgerufene β-Zellproliferation könnte als Therapieansatz zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ II in Frage kommen.

F Literaturverzeichnis

Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Ogsuga J, Shionoiri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuuchi M 1998 Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. J Clin Invest.;101(8):1784-8.

a Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP IV, Boyd AE, 3rd, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J and Nelson DA 1995 Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion. Science (Wash DC) 268: 423-426

b Aguilar-Bryan L, Clement JP IV, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A and Bryan J 1998 Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. Physiol Rev 78: 227-245

Alberti KG, Zimmet PZ 1998 Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med. 15(7):539-53.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1995 Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft

Ashcroft FM and Rorsman P 1989 Electrophysiology of the pancreatic -cell. Prog Biophys Mol Biol.;54(2):87-143. Review.

Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB 1992 Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. Endocrinology 130:167-178

Aspinwall CA, Lakey JR, Kennedy RT 1999 Insulin stimulated insulin secretion in single pancreatic beta cells. J. Biol. Chem. 274:6360-6365

Banting FG, CH Best, and JJR Macleod 1922 The internal secretion of the pancreas (Abstract). Am. J. Physiol. 59: 479

Bell GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ, Najarian RC 1983 Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. Nature 304:368-371

Benito M, Valverde AM, Lorenzo M 1996 IGF-I: a mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. Int J Biochem Cell Biol.;28(5):499-510. Review.

Berger M 2000 Sekundäre Therapieformen: Insulintherapie, orale Antidiabetika. In Berger M (ed.) Diabetes mellitus. Urban und Fischer, München, Jena pp 478-487

Berger M, Pieper T 2000 Definition und Klassifikation des Diabetes mellitus. In Berger M (ed.) Diabetes mellitus. Urban und Fischer, München, Jena pp 12-14

Berger M, Trautner C 2000 Epidemiologie des Diabetes mellitus. In Berger M (ed.) Diabetes mellitus. Urban und Fischer, München, Jena pp 15-24

Bernard-Kargar C, Ktorza A 2001 Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions. Diabetes;50 Suppl 1:S30-5. Review.

Bode HP, Moormann B, Dabew R, Göke B 1999 Glucagon-like peptide 1 elevates cytosolic calcium in pancreatic beta-cells independently of protein kinase A. Endocrinology;140(9):3919-27.

Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, Rubio I, Wetzker R, Wymann MP 1998: Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. Science 282:293-296

a Bonner-Weir S. 2000 Islet growth and development in the adult. J Mol Endocrinol.;24(3):297-302. Review

b Bonner-Weir S. 2000 Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. Endocrinology.;141(6):1926-9. Review.

c Bonner-Weir S. 2001 beta-cell turnover: its assessment and implications. Diabetes.;50 Suppl 1:S20-4.

Brownawell AM, Kops GJ, Macara IG, Burgering BM. 2001 Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. Mol Cell Biol.;21(10):3534-46

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME 1999 Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. Cell 96:857-868

a Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Hörsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR 1998 A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. Mol. Cell 2: 559-569

b Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science;289(5487):2122-5.

Bryant MG, Bloom SR, Polak JM 1983 Measurement of gut hormonal peptides in biopsies from human stomach and proximal intestine. Gut 24:114-119

Burks DJ, White MF 2001 IRS proteins and beta-cell function. Diabetes; 50 Suppl 1:S140-5. Review.

a Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M 1999 Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in β (INS-1)-cells. Diabetologia 42:856–864

b Buteau J, Foisy S, Rhodes CJ, Carpenter L, Biden TJ, Prentki M 2001 Protein kinase Czeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation. Diabetes; 50(10):2237-43

Cass LA, Summers SA, Prendergast GV, Backer JM, Birnbaum MJ, Meinkoth JL 1999 Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation. Mol Cell Biol. 19:5882-5891

Cerasi E, Boitard C, Efendic S, Ferrani E, Henquin JC, Steiner Df 2001 The islet in type II diabetes: back to the center stage. Diabetes 50 (Suppl. 1): S1-S3

Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, Chen H, Qiu Y 2001 Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. J Biol Chem.;276(34):31858-62.

Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR 1998 Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. Biochem. J. 335:1-13

Cousin SP, Hügl SR, Myers MG, White MF, Reifel-Miller A, Rhodes CJ 1999 Stimulation of pancreatic beta-cell proliferation by growth hormone is glucose-dependent: signal transduction via Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) with no crosstalk to insulin receptor substrate-mediated mitogenic signalling. Biochem J 344:649–658

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

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. 1997 Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell 91:231-241

Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A 1997: Signal characteristics of G protein transactivated EGF receptor. EMBO J. 16:7032-7044

DeFronzo RA 1997 Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, hypertension, dyslipidemia and atherosclerosis. Neth J Med 50:191-197

Della Rocca GJ, Maudsley S, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Luttrell LM 1999 Pleiotropic coupling of G protein-coupled receptors to the mitogen-activated protein kinase cascade. Role of focal adhesions and receptor tyrosine kinases. J. Biol. Chem. 274:13978-13984

Dickson LM, Lingohr MK, McCuaig J, Hugl SR, Snow L, Kahn BB, Myers MG Jr, Rhodes CJ 2001 Differential activation of protein kinase B and p70(S6)K by glucose and insulin-like growth factor 1 in pancreatic beta-cells (INS-1). J Biol Chem.;276(24):21110-20.

Dillon JS, Tanizawa Y, Wheeler MB, Leng XH, Ligon BB, Rabin DU, Yoo-Warren H, Permutt MA, Boyd AE 3rd. 1993 Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. Endocrinology;133(4):1907-10.

Dudek H, Datta SR, Franke TF, Brinbaum M, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME 1997 Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. Science 275:661-665

Duvillie B, Cordonnier N, Deltour L, Dandoy-Dron F, Itier JM, Monthioux E, Jami J, Joshi RL, Bucchini D 1997 Phenotypic alterations in insulin-deficient mutant mice. Proc Natl Acad Sci U S A.;94(10):5137-40.

Eissele R, Göke R, Weichhardt U, Fehmann HC, Arnold R, Göke B 1992 Glucagon-like peptide-I cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig, and man. Eur J Clin Invest 22:283-291

Efanova IB, Zaitsev SV, Zhivotovsky B, Kohler M, Efendic S, Orrenius S, Berggren PO 1998 Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic

beta-cells. A process dependent on intracellular Ca2+ concentration. J Biol Chem.;273(50):33501-7.

Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V 1993 Glucagon-like peptide 1(7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. J Endocrinol 138:159-166

Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Arai Y 1964 Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose administration. J Clin Endocrinol Metab 24:1076-1082

a Fehmann HC, Göke R, Göke B 1995: Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. Endocr. Rev. 16:390-410

b Fehmann HC, Habener JF 1992 Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37) stimulation of of proinsulin gene expression and proinsulin sysnthesis in bTC-1 insulinoma cells. Endocrinology 130:159-166

Felig P, Bergman M 1990 Integrated physiology of carbohydrate metabolism. Rifkin H, Porte D (eds) Ellenberg and Rifkin`s diabeters mellitus. Elsevier, New York

Filippa N, Sable CL, Filloux C, Hemmings B, Van Obbergehn E 1999: Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. Mol. Cell. Biol. 19:4989-5000

Frattali AL, Treadway JL, and Pessin JE 1992: Insulin/IGF-1 hybrid receptors: implications for the dominant – negative phenotype in syndromes of insulin resistance. J. Cell. Biochem. 48:43-50

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC 1998 Phosphoinositide kinases. Annu Rev Biochem 67:481-507.

Gang X, Stoffers A, Habener JF, Bonner-Weir S 1999: Exendin-4 stimulates both β-cell replication and neogenesis resulting in increased β-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. Diabetes 48:2270-2276

Gerbert G, Thomas C (ed.) 1992 Grundlagen der klinischen Medizin, Bd. 5 Endokrines System, Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 109-120

Goldfine IR, Youngren JF 1998 Contributions of the American Journal of Physiology to the discovery of insulin. Am. J. Physiol. 274:E207-E209

Grupe A, Hultgren B, Ryan A, Ma YH, Bauer M, Stewart TA. 1995 Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaining glucose homeostasis. Cell. 83(1):69-78.

Harris MI, Hadden WC, Knowler WC, Bennett PH 1987 Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance and plasma glucose levels in U.S. population aged 20-74 yr. Diabetes 36(4): 523-34

Heller H 1935 Über das insulinotrope Hormon der Darmschleimhaut (Duodenin). Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 177:127-133

Heller RS, Aponte GW 1995 Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-like peptide-1 (7-36)amide. Am J Physiol 269:G853–G860

Hellerstrom C, Swenne I 1991 Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic beta-cells. Diabetes.;40 Suppl 2:89-93. Review.

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

Herrmann-Rinke C, McGregor GP, Göke B 2000 Calcitonin gene-related peptide potently stimulates glucagon-like peptide-1 release in the isolated perfused rat ileum. Peptides.;21(3):431-7.

Holgado-Madruga M, Emlet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ 1996: A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. Nature 379:560-563

Holst JJ, Orskov C, Van Nielsen O, Schwartz TW 1987 Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. FEBS Lett

Holst LS, Mulder H, Manganiello V, Sundler F, Ahren B, Holm C, Deggerman E 1998: Protein kinase B is expressed in pancreatic beta-cells and activated upon stimulation with insulin-like growth factor 1. Biochem. Biophys. Res. Com. 250:181-186

Holz GG, Leech CA, Heller RS, Castonguay M, Habener JF 1999: cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca^{2+} stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic beta-cells. A Ca^{2+} signaling system stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37). J. Biol. Chem. 274:14147-14156

Hoorens A, Van de Casteele M, Kloppel G, Pipeleers D 1996 Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. J.Clin.Invest., 98 (7) :1568-1574

Hügl SR, White MF, Rhodes CJ 1998 Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1)-stimulated pancreatic ß-cell growth is glucose-dependent—synergistic activation of insulin- receptor substrate-mediated signal-transduction pathways by glucose and IGF-1 in INS-1 cells. J Biol Chem 273:17771–17779

Huong PL, Kolk AH, Eggelte TA, Verstijnen CP, Gilis H, Hendriks JT 1991 Measurement of antigen specific lymphocyte proliferation using 5-bromo-deoxyuridine incorporation. An easy and low cost alternative to radioactive thymidine incorporation. J Immunol Methods 5:243-245

Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthioux E, Jami J, Bucchini D. 1996 Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. EMBO J.;15(7):1542-7.

Kadowaki T, Tobe K, Honda-Yamamoto R, Tamemoto H, Kaburagi Y, Momomura K, Ueki K, Takahashi Y, Yamauchi T, Akanuma Y, Yazaki Y 1996. Signal transduction mechanism of insulin and insulin-like growth factor-1. Endocr J.;43 Suppl:S33-41. Review

a Kahn CR 1995 Etiology and pathogenesis of type II diabetes mellitus and related disorders. Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism; Second Edition; J.B. Lipincott Company, p. 1210-1216

b Kahn CR 1996 New concepts in the pathogenesis of diabetes mellitus. In: Schrier RW, Baxter JD, Abboud F, Fauci AS, eds. Advances in Internal Medicine, 41: p. 285-321

a KiefferTJ, Habener JF 1999 The glucagon-like peptides. Endocr Rev 20:876-913

b Kieffer TJ, McIntosh CHS, Pederson RA 1995 Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. Endocrinology 136:3585-3596.

Klepser TB, Kelly MW 1997 Metformin hydrochloride: an antihyperglycemic agent. Am J Health Syst Pharm. ;54(8):893-903. Review.

Kloppel G, Lohr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU1985. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. Surv Synth Pathol Res.;4(2):110-25. Review.

Kolch W 2000 Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. Biochem J 351:289-305

Krentz AJ, Ferner RE, Bailey CJ. 1994 Comparative tolerability profiles of oral antidiabetic agents. Drug Saf.;11(4):223-41. Review.

a Kreymann B, Ghatei MA, Burnet P, Williams G, Kanse S, Diani AR, Bloom SR 1989 Characterization of glucagon-like peptide-1-(7-36)amide in the hypothalamus. Brain Res 502:325-331

b Kreymann B, Ghatei MA, Williams G, Bloom SR 1987 Glucagon-like peptide-1 (7-36): a physiological incretin in man. Lancet 2:1300-1304

Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T 2000 Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. Diabetes ;49(11):1880-9.

Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR 1999: Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. Cell 96:329-339

Lamothe B, Baudry A, Christoffersen CT, De Meyts P, Jami J, Bucchini D, Joshi RL 1998 Insulin receptor-deficient cells as a new tool for dissecting complex interplay in insulin and insulin-like growth factors FEBS Lett. Apr 24;426(3):381.

Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ, Ørskov C 1997 Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. Neuroscience 77:257-270

Leevers SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD 1999: Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. Curr. Opin. Cell Biol. 11:219-225

Leibiger IB, Leibiger B, Moede T, Berggren PO 1998 Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM kinase pathways. Mol. Cell. 1:933-938

Li J, DeFea K, Roth RA 1999. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. J Biol Chem.; 274(14):9351-6.

Löffler, 1999 Basiswissen Biochemie, Springer Verlag,

Lopaczynski W 1999 Differential regulation of signaling pathways for insulin and insulin-like growth factor I. Acta Biochim Pol.;46(1):51-60. Review.

Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W, Huang XY 2000. Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins.Cell.; 102(5):635-46.

Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY 2001 Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. Diabetes;50(8):1683-90.

Malecki M, Krolewski AS 2000 [Molecular background and clinical characteristics of autosomal dominant type 2 diabetes mellitus]. Przegl Lek. 57 Suppl 3:13-8. Review.

Mandrup-Poulsen 2001 β-Cell Apoptosis Diabetes.;50 Suppl 1:S20-4.

Marley PD, Thomson KA 1996 The Ca++/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitors KN62 and KN93, and their inactive analogues KN04 and KN92, inhibit nicotinic activation of tyrosine hydroxylase in bovine chromaffin cells. Biochem Biophys Res Commun.;221(1):15-8.

McIntyre N, Holsworth DC, Turner DS 1964 New interpretation of oral glucose tolerance. Lancet 2:20-21

Medici F, Hawa M, Ianari A, Pyke DA, Leslie RD 1999. Concordance rate for type II diabetes mellitus in monozygotic twins: actual analysis. Diabetologia; 42(2):146-50

a Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF 1986 Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. J Biol Chem 261:11880-11889

b Mojsov S, Kopczynski MG, Habener JF 1990 Both amidated and nonamidates forms of glucagon-like peptide I are synthesized in the rat intestine and the pancreas. J Biol Chem 265:8001-8008

Moody AJ 1980 Gut glucagon-like immunoreactivity. Clin Gastroenterol 9:699-709

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

Müller-Wieland D, Häring HU 2001 Diabetes mellitus. In Ganten D, Ruckpaul K (eds) Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp223-257

Murga C, Laguinge L, Wetzker R, Cuadrado A, Gutkind JS 1998: Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase gamma. J. Biol. Chem. 273:19080-19085

Nattrass M, Bailey CJ 1999 New agents for Type II diabetes. Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.;13(2):309-29. Review.

a Nauck MA, Kleine N, Ørskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W 1993 Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide1(7-36) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes patients. Diabetologia 36:741-744

b Nauck M 1996 Therapeutic potential of glucagon-like peptide 1 in type II diabetes. Diabetic Med 13:S39–S43

a Nielsen JH, Svensson C, Galsgaard ED, Moldrup A, Billestrup N. 1999 Beta cell proliferation and growth factors. J Mol Med.;77(1):62-6. Review.

b Nielsen JH, Galsgaard ED, Moldrup A, Friedrichsen BN, Billestrup N, Hansen JA, Lee YC, Carlsson C. 2001 Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors. Diabetes.;50 Suppl 1:S25-9. Review.

Niki I, Okazaki K, Saitoh M, Niki A, Niki H, Tamagawa T, Iguchi A, Hidaka H 1993 Presence and possible involvement of Ca/calmodulin-dependent protein kinases in insulin release from the rat pancreatic beta cell. Biochem Biophys Res Commun.;191(1):255-61

O'brien RM, Streeper RS, Ayala JE, Stadelmaier BT, Hornbuckle LA 2001 Insulin-regulated gene expression. Biochem Soc Trans;29(4):552-8.

Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC. 1992 Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. J Biol Chem 267:10709-10715

Parsons JA, Bartke A, Sorenson RL 1995 Number and size of islets of Langerhans in pregnant human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. Endocrinology 136:2013–2021

Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL 1992 Adaptation of islets to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. Endocrinology 130:1459–1466

Parulkar AA, Pendergrass ML, Granda-Ayala R, Lee TR, Fonseca VA. 2001

Nonhypoglycemic effects of thiazolidinediones. Ann Intern Med.;134(1):61-71. Review

Pende M, Kozma SC, Jaquet M, Oorschot V, Burcelin R, Le Marchand-Brustel Y, Klumperman J, Thorens B, Thomas G. 2000 Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. Nature. 21-28;408(6815):994-7

Philipson LH, Steiner DF 1995 Pas de deux or more: the sulfonylurea receptor and K+ channels. Science.;268(5209):372-3.

Rachman J, Turner RC 1995 Drugs on the horizon for treatment of type 2 diabetes. Diabetic Med 12:467-478

Richards JS 2001 New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. Mol Endocrinol 15:209-218

Rinninger F, Greten H 2001 in: Greten H (ed), Schettler G Innere Medizin,10. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; pp 604-642

Roberge JN, Brubaker PL 1993 Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. Endocrinology 133:233-240

Rothenberg PL, Willison D, Simon J, Wolf BA 1995: Glucose-induced insulin receptor tyrosine phosphorylation in insulin-secreting beta-cells. Diabetes 44:802-809

Salapek AM, MacDonald PE, Gaisona HY, Wheeler MB 1999: Mutation in the third cytoplasmatic domain of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor can functionally uncouple GLP-1-stimulated insulin secretion in HIT-T15 cells. Mol. Endorinol. 13:1305-1317

Scharfmann R, Czernichow P 1996: Differentiation and growth of pancreatic beta-cells. Diabetes Metab. 22:223-228

Schirra J, Katschinski M, Weidmann C, Schäfer T, Wank U, Arnold R, Göke B 1996 Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. J Clin Invest 97:92-103

Schneider, T. Diabetes through the ages 1972: a salute to insulin. S. Afr. Med. J. 46: 1394-1400

Schopjans C, Auwerx J 2000 Thiazolidinediones: an update, Lancet 355:1008-1010

Shima K, Hirota M, Ohboshi C, Sato M, Nishino T 1987 Release of glucagon-like peptide-1 immunoreactivity from the perfused rat pancreas. Acta Endocrinol (Copenh) 114:531-536

Sjolund D, Sanden G, Hakanson R, Sundler F 1983 Endocrine cells in human intestine. An immunocytochemical study. Gastroenterology 85:1120-1130

Steil GM, Trivedi N, Jonas JC, Hasenkamp WM, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC. 2001 Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. Am J Physiol Endocrinol Metab.;280(5):E788-96.

Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM 2000 Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas Diabetes. 49(5):741-8.

Terauchi Y, Sakura H, Yasuda K, Iwamoto K, Takahashi N, Ito K, Kasai H, Suzuki H, Ueda O, Kamada N, 1995 Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. J. Biol. Chem. 270:30253-30256

Thorens B, Porret A, Bühler L, Deng SP, Morel P, Widman C 1993 Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor: demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-9(9-39) an antagonist of the receptor. Diabetes 42:1678-1682

Trümper A, Trümper K, Trusheim H, Arnold R, Göke B, Hörsch D 2001. Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Is a Growth Factor for beta (INS-1) Cells by Pleiotropic Signaling. Mol Endocrinol. (9):1559-70

Unger RH, Eisentraut AM 1969 Entero-insular axis. Arch Intern Med 123:261-266

Velloso LA, Carneiro EM, Crepaldi SC, Boschero AC, Saad MJ 1995: Glucose- and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and its primary substrates IRS-1 and IRS-2 in rat pancreatic islets. FEBS Lett. 27:352-257

Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR 1999: Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. J. Clin. Invest. 103: 931-941

White MF 1998: The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. Mol. Cell. Biochem. 182:3-11

Whiters DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF1998: Disruption of IRS-1 causes type 2 diabetes in mice. Nature 391:900-904

Wilkinson MG, Millar JB 2000 Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. FASEB J 14:2147-2157

Wiltshire S, Hattersley AT, Hitman GA, Walker M, Levy JC, Sampson M, O'Rahilly S, Frayling TM, Bell JI, Lathrop GM, Bennett A, Dhillon R, Fletcher C, Groves CJ, Jones E, Prestwich P, Simecek N, Rao PV, Wishart M, Foxon R,

Howell S, Smedley D, Cardon LR, Menzel S, McCarthy MI. 2001 A genomewide scan for loci predisposing to type 2 diabetes in a U.K. population (the Diabetes UK Warren 2 Repository): analysis of 573 pedigrees provides independent replication of a susceptibility locus on chromosome 1q. Am J Hum Genet. ;69(3):553-69

Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. 1998 Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. Nature. 26;391(6670):900-4

Wolffenbuttel HR, Graal MB 1996 New treatments for patients with type 2 diabetes mellitus. Postgrad Med J 72:657-662

Xia X, Serrero G 1999 Multiple forms of p55PIK, a regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase, are generated by alternative initiation of translation. Biochem J.;341 (Pt 3):831-7.

Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Yoshizawa F, Aizawa S, Akanuma Y, Sonenberg N, Yazaki Y, Kadowaki T. 1996 Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. Mol Cell Biol.;16(6):3074-84.

Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR 1998: Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. Nature 396:584-587

Yoshimoto S, Hirota M, Ohboshi C, Shima K 1989 Identification of glucagon-like peptide-1(7-36) amide in rat brain. Ann Clin Biochem 26:169-171

Zhou J, Wang X, Pineyro MA, Egan JM 1999: Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon and insulin secreting cells. Diabetes 48:2358-2366

Zunz E, LaBarre J 1929 Contributions a l’etude des variations physiologiques de la secretion interne du pancreas: realations entre les secretions externe et interne du pancreas. Arch Int Physiol Biochim 31:20-44

G Anhang

1. Abkürzungen

AC: Adenylat Cyclase
ATP: Adenosintriphosphat
Bcl: B-cell chronic lymphatic leucemia
BrdU: 5-Bromo-2`-desoxyuridin
BSA: Bovines Serumalbumin
CaM-KK: Ca^{++}/calmodulin dependent protein kinase kinase;
ELISA: enzymlinked immunosorbent assay
ERK: extracellular signal regulated kinase
FBS (FCS): fetales Kälberserum
Gab-1: Grb-2 associated binder-1
GF: Growth factor
GIP: glucose-dependent insulinotropic polypeptide;
GLP-1: glucagon-like peptide-1;
GLUT2: glucose transporter 2
Gp: G-Protein
Grb-2: Growth factor receptor bound-2
GSK-3: Glycogen-synthase kinase-3
HEPES: N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N`-[2-ethanesulfonic acid]
HRP: horse-radish-peroxidasse
IGF-1: insulin-like growth factor-1
IR: Insulinrezeptor
IRS: insulin receptor substrate
JAK: Janus Kinase
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MEK: MAP/ERK-Kinase
mTOR: mammalian target of rapamycin
$p70^{S6K}$: p70 S6-kinase;
PDK: phosphoinositide dependent kinase;
PH: pleckstring homology;
PI 3-K: phosphatidylinositol 3-kinase;
PKA: cAMP-dependent protein kinase
PKB/Akt: protein kinase B/c-Akt
PKC: protein kinase C
PtdIns-P: Phosphatidylinositol-Phosphat
pY: phosphotyrosine.
RTK: receptor tyrosine kinase
SDS-PAGE: Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM: standard error of mean
SH2: src-homology-2
SOS: son of sevenless
TUNEL: terminale Desoxynucleotidyltransferase- mediated dUTP nick end labeling

2. Akademische Lehrer

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Daut, Effendy, Engel, Fuhrmann, Gemsa, Geus, Göke, Gotzen, Grzeschik, Gudermann, Habermehl, Happle, Hasilik, Hofmann, Joseph, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Klug, Kroll, Lammel, Lang, Lennartz, Maisch, Martin, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pfab, Radsak, Remschmidt, Richter, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schneider, Schüffel, Seitz, Steiniger, Stöckmann, Vohland, von Wichert, Weihe, Werner

3. Lebenslauf

I Persönliche Daten

Name : Katja Trümper
Geburtstag : 25. Januar 1975
Geburtsort : Fritzlar
Staatsangehörigkeit : deutsch

II Schulausbildung

1981 – 85 Grundschule Fritzlar
1985 – 94 Gymnasium Ursulinenschule Fritzlar
1994 Abitur an der Ursulinenschule

III Medizinische Ausbildung

Oktober 1994 – Juni 2001 Medizinstudium an der Philipps – Universität Marburg

August 1996 Ärztliche Vorprüfung
August 1997 1. Staatsexamen
März 2000 2. Staatsexamen
Juni 2001 3. Staatsexamen

März 1998 Beginn der Dissertation in der Klinischen Forschergruppe für gastrointestinale Endokrinologie
Thema der Arbeit : Differentielle Aktivierung der Phosphatidylinositol-3- kinase und der Proteinkinase B/ Akt durch Insulin, IGF-1 und GLP-1 in der β-Zell-Linie INS-1.

Jan. – Dez. 2000 Studentische Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. med. D. Hörsch .
Aufgabenbereich : Untersuchung des PI3K/ PKB Signalweges unter Stimulation mit GIP und Glucose.

April 2000 – April 2001 Praktisches Jahr

1. Tertial – Innere Medizin – Klinik für Innere Medizin der Univ.
   Marburg
2. Tertial – Chirurgie – Klinik für Unfallchirurgie / Klinik für Allgemeinchirurgie Univ. Marburg
3. Tertial – Kinder- und Jugendpsychiatrie – Klinik für Psychiatrie
   und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters

2001 Nachtwachen in der Klinik für Kinder – und Jugendpsychiatrie / Marburg

Juli 2001 - März 2002 Ärztin im Praktikum in der gastroenterologischen Klinik/ Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

seit April 2002 Ärztin im Praktikum in der Medizinischen Klinik 2
Klinikum Großhadern der LMU - München

4. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Promotionsarbeit mit dem Titel :

„ Die differentielle Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-kinase und der PKB/Akt durch Insulin, IGF-1 und GLP-1 in der b **-Zell-Linie INS-1“**

am Zentrum für Innere Medizin der Philipps -Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Arnold mit der Unterstützung von Herrn Dr. med. D. Hörsch selbstständig durchgeführt habe.

Außer den von mir angegebenen Quellen, habe ich keine weiteren Quellen und Hilfsmittel verwendet. Bisher habe ich in keinem in- oder ausländischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion gestellt, noch die vorliegende Arbeit oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg 2002

5. Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Rudolf Arnold für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Herrn Dr. med. Dieter Hörsch danke ich für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung während der experimentellen Durchführung und der Interpretation der Promotionsarbeit. Durch sein eigenes Vorbild weckte er das Interesse an wissenschaftlichen Fragestellungen und gab seine Begeisterung für Forschung an mich weiter. Ich danke für die hohe Bereitschaft bei Fragen und Problemen jederzeit Anregungen und Hilfestellungen zu geben. Ich danke auch für die motivierenden Ratschläge beim Verfassen der Dissertationsschrift.

Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Heidi Trusheim und Herrn Harald Schmidt für ihre große Hilfsbereitschaft, ihre wertvollen Ratschläge und Diskussionen.

Meine Schwestern Andrea und Jutta, die zur gleichen Arbeitsgruppe gehören, sorgten dafür, dass der Humor nicht zu kurz kam. Auch wenn Versuchsergebnisse nicht so wie erwartet ausfielen, gab es trotzdem einen Grund zu lachen.

Bei meiner Studienfreundin Jutta Diederichs, die zeitgleich mit mir promovierte, bedanke ich mich für ihre Tipps, den anregenden Gedankenaustausch und ihren ansteckenden Optimismus.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dr. Wagner (Frau Petra Staats, Frau Heike Priebe, Frau Katharina Oblesch) Frau Manuela Kauß und Frau Karin Münch danke ich herzlich für ihre stete, freundliche Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mit liebevoller Anteilnahme meinen Lebensweg begleiten.