

Die Rolle des Glucosesensors Glucokinase im Glucosemetabolismus und mitochondrialen Stoffwechsel in Beta-Zellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Ing. (FH) Heike Schmitt

geboren am 11. Januar 1977, in Bamberg

2010

Referent: Prof. Dr. Sigurd Lenzen
Korreferentin: Prof. Dr. Simone Baltrusch
Tag der Promotion: 09.03.2010

Kurzzusammenfassung

Das glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase fungiert in den Beta-Zellen des Pankreas als Glucosensensor und katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der glucoseinduzierten Insulinsekretion. Die Enzymaktivität der Glucokinase wird posttranslational durch eine Interaktion mit der 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase aktiviert und kann ebenfalls durch chemisch synthetisierte Aktivatoren der Glucokinase erhöht werden. Die Heptulose Mannoheptulose ist ein bekannter kompetitiver Inhibitor der Glucokinase. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Zuckeralkohol Perseitol ebenfalls in der Lage war, die Glucokinaseenzymaktivität zu hemmen. Die Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus Typ 2 wird sowohl durch einen Insulinsekretionsdefekt als auch eine periphere Insulinresistenz hervorgerufen und ist häufig mit einer Adipositas vergesellschaftet. Dadurch sind die Beta-Zellen im progredienten Verlauf der Erkrankung neben der erhöhten Glucosekonzentration einer chronisch erhöhten Konzentration an freien Fettsäuren ausgesetzt. Eine Glucolipotoxizität wird daher als Ursache einer Beta-Zell-Funktionsstörung bis hin zum Zelltod diskutiert. Somit war es das Ziel dieser Arbeit aufzuklären, ob Glucose direkt die Beta-Zellen schädigt und welche Rolle das Glucosensorenzym Glucokinase möglicherweise in einem solchen Prozess spielt. Hierzu wurde das RheoSwitch-System in insulinproduzierenden RINm5F-Zellen etabliert, welches eine regulierbare Expression der Glucokinase als Fluoreszenzfusionsprotein ermöglichte. Eine Toxizität konnte in RINm5F-Zellen durch Palmitinsäure induziert werden. Eine hohe Glucosekonzentration verminderte weder die Vitalität der Zellen, noch verstärkte sie die Lipotoxizität. Im Gegenteil konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Glucokinaseenzymaktivität in den Zellen mit einem Anstieg der glucoseinduzierten Insulinsekretion korrelierte. Dies weist auf eine gute Koordination zwischen Glykolyse und mitochondrialem Stoffwechsel hin, wie sie für die glucosestimulierte Insulinsekretion der Beta-Zellen notwendig ist. Nachfolgend konnte fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden, dass das mitochondriale Membranpotential in RINm5F-Zellen mit Glucokinaseexpression und nach Vorinkubation bei hoher Glucose schneller nach einem Glucosestimulus ansteigt. Dieses Ergebnis konnte an primären Beta-Zellen bestätigt werden. Mittels selektiver Photokonversion einzelner Mitochondrien konnte zudem eine intakte Morphologie und vor allem die Dynamik des mitochondrialen Netzwerkes in RINm5F-Zellen gezeigt werden. Die Hypothese, dass die Glucokinase bei hohen Glucosekonzentrationen ursächlich für eine Beta-Zell-Dysfunktion ist, konnte somit nicht bestätigt werden.

Schlagwörter: Diabetes mellitus, Glucokinase, Toxizität, Mitochondrien

Abstract

In pancreatic beta cells, the glucose phosphorylating enzyme glucokinase acts as a glucose sensor and catalyzes the rate-limiting step for initiation of glucose-induced insulin secretion. Activation of glucokinase is endogenously provoked by interaction with the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and can be effectively achieved also by a new class of chemical compounds. The heptose mannoheptulose is a well-known competitive inhibitor of glucokinase. The present work revealed that also the corresponding sugar alcohol perseitol was able to inhibit glucokinase. Type 2 diabetes mellitus is a metabolic disease caused by both, a defective insulin secretion and peripheral insulin resistance and is virtually always accompanied with obesity. Thus, without fail the beta cells of type 2 diabetic individuals are concurrently exposed to high concentrations of glucose and free fatty acids. Therefore glucolipotoxicity has been proposed to evoke beta cell dysfunction and cell death. The aim of this study was to determine whether glucose is toxic to beta cells and whether the glucose sensor enzyme glucokinase mediates this process. For this purpose, the RheoSwitch system was established in insulin-producing RINm5F cells allowing regulated precise expression of glucokinase as a fluorescent fusion protein. Toxicity of palmitic acid to RINm5F cells could be clearly demonstrated, but high glucose culture neither induced toxicity alone nor free fatty acid amplified beta-cell perturbation. In contrast, there was a direct correlation between the glucokinase enzyme activity and glucose-induced insulin secretion indicating tight coupling between glycolysis and mitochondrial metabolism. Thus, a beneficial effect of glucokinase expression on glucose-induced insulin secretion was observed. Furthermore, the change of mitochondrial membrane potential upon glucose stimulation was investigated in RINm5F cells by fluorescence microscopy. High glucokinase expression in RINm5F cells or previous exposure to high glucose better transmitted the metabolic signal to the mitochondria resulting in a significantly faster increase of the mitochondrial membrane potential after glucose stimulation. These results could be confirmed in primary rat beta cells. Finally, mitochondrial dynamics were analyzed in RINm5F cells with selective photoconversion on the level of a single mitochondrion revealing a vital highly dynamic mitochondrial network with frequent fission and fusion events. In conclusion, the experiments do not support the hypothesis that glucokinase mediates glucose toxicity.

Keywords: Diabetes mellitus, Glucokinase, Toxicity, Mitochondria

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung

Abstract

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus.....	1
1.2	Das glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase.....	1
1.3	Die glucoseinduzierte Insulinsekretion in Beta-Zellen	4
1.4	Inhibitoren der Glucokinase	5
1.5	Aktivatoren der Glucokinase.....	7
1.6	Glucolipotoxizität insulinproduzierender Beta-Zellen.....	8
1.7	Der mitochondriale Stoffwechsel in Beta-Zellen.....	9
1.8	Funktion der Mitochondriendynamik in Beta-Zellen	12
1.9	Fragestellung	17
2	Publikationen	18
	Combination of biotransformation and chromatography for the isolation and purification of mannoheptulose	19
	Activation of glucokinase by the bifunctional enzyme 6-phosphofructo- 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and the chemical compound LY2121260.....	45
	Glucokinase mediates coupling of glycolysis to mitochondrial metabolism but not beta-cell damage at high glucose exposure	77
3	Diskussion	114
3.1	Isolierung und Aufreinigung von Mannoheptulose aus der Avocado über ein kombiniertes Verfahren aus Biotransformation und Chromatographie	114
3.2	Untersuchungen zur Hemmung der Glucokinaseaktivität durch Mannoheptulose, Perseitol und Sedoheptulose	116
3.3	Die Glucokinase und deren Substrat Glucose vermitteln keine Toxizität in Beta-Zellen	118
3.4	Der Einfluss der Glucokinase auf die Kopplung der Glykolyse an den mitochondrialen Stoffwechsel in Beta-Zellen.....	121
3.5	Die Morphologie der Mitochondrien in Beta-Zellen	122
4	Zusammenfassung	124
5	Literaturverzeichnis	127
6	Publikationen	133
7	Curriculum Vitae	134
8	Erklärung	136
9	Danksagung	137

1 Einleitung

1.1 Die Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus

Die zentrale Steuerung des Kohlenhydratstoffwechsels übernimmt das Peptidhormon Insulin. Um eine ausreichende Versorgung des Organismus mit Glucose sicherzustellen, wird Insulin aus den Beta-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas reguliert freigesetzt (Waldhäusl & Lenzen 2007). Der Diabetes mellitus ist eine Regulationsstörung des Stoffwechsels, die durch den Leitbefund der chronischen Hyperglykämie charakterisiert ist. Der absolute Insulinmangel führt zu den klassischen Symptomen Gewichtsverlust, Polydipsie, Polyurie und Ketoazidose. Dieser wird im Typ 1 Diabetes mellitus durch eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas hervorgerufen, die wiederum durch eine T-Zell-vermittelte Autoimmunreaktion ausgelöst wird (Waldhäusl & Lenzen 2007). Neben dem Typ 1 Diabetes mellitus, an dem 5-10 % der Menschen mit Diabetes in Deutschland leiden, sind dem Typ 2 Diabetes mellitus ca. 90 % der Patienten mit Diabetes zuzuordnen. Weltweit ist eine Zunahme der Erkrankungshäufigkeit bei Diabetes mellitus zu beobachten, die beim Typ 2 Diabetes mellitus stärker ausgeprägt ist und mit dem Anstieg des Übergewichts als wichtigem Risikofaktor in Verbindung gebracht wird. Der Typ 2 Diabetes mellitus, an dem 4-5 % der Bevölkerung in den westlichen Industrieländern leiden, kann sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem sekretorischen Defekt mit einer Insulinresistenz der peripheren Gewebe erstrecken (Kerner & Brückel 2009). Die Insulinsekretion der Beta-Zellen reicht zur Aufrechterhaltung der Blutglucosehomöostase nicht aus und ein chronisch erhöhter Blutglucosespiegel ist die Folge. Der Typ 2 Diabetes mellitus ist häufig mit anderen Erkrankungen wie z.B. arterieller Hypertonie und Dyslipidämie im Rahmen des sogenannten metabolischen Syndroms assoziiert (Kerner & Brückel 2009; Matthaei & Schernthaner 2009).

1.2 Das glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase

Das Enzym Glucokinase wird vorwiegend in der Leber und in den Beta-Zellen des Pankreas exprimiert. Im ersten Schritt des Glucosemetabolismus in eukaryontischen Zellen überträgt das Enzym Glucokinase (EC 2.7.1.1), wie die anderen Hexokinase-Isoenzyme, eine Phosphatgruppe des ATP auf die 6-Hydroxylgruppe des Glucosemoleküls und wird daher auch als Hexokinase IV bezeichnet (Lenzen & Panten 1988). Die Hexokinase-Isoenzyme haben ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa und eine hohe Affinität für das Substrat Glucose mit K_m -Werten im Bereich von 20-130 $\mu\text{mol/l}$. Sie zeichnen sich im Gegensatz zur

Glucokinase durch eine Feedback-Hemmung physiologischer Konzentrationen von Glucose-6-phosphat aus (Middleton 1990). Die Glucokinase besitzt ein deutlich geringeres Molekulargewicht von ca. 52 kDa und mit einem $S_{0,5}$ -Wert für Glucose von 8 - 10 mmol/l eine wesentlich geringere Affinität zum Substrat Glucose als die Hexokinase-Isoenzyme I-III (Lenzen & Panten 1988; Matschinsky 1990). Die Glucokinase zeigt eine kooperative Reaktionskinetik für das Substrat Glucose mit einem Hill-Koeffizienten von $n = 1,5 - 1,7$ und einem sigmoidalen Reaktionsverlauf. Der Umkehrpunkt dieser sigmoidalen Aktivitätskurve liegt im Bereich von etwa 5 mmol/l Glucose und damit nahe an der Schwelle der Beta-Zelle des Pankreas für die Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion (Lenzen 1992; Tiedge *et al.* 1997). Durch diese positive Kooperativität des Enzyms Glucokinase besteht die Möglichkeit, dass im Fastenzustand geringe Anstiege des Blutglucosespiegels über 5 mmol/l zu einer deutlicheren Zunahme der Glucosephosphorylierung führen, als dies bei einer regulären Michaelis-Menten-Kinetik zu erwarten wäre (Matschinsky *et al.* 1993).

Die Glucokinase-mRNA der beiden Glucokinase-Isoformen der Leber und des Pankreas wird von einem Glucokinasegen, bestehend aus zehn Exons und zwei gewebespezifischen Kontrollregionen, transkribiert. Exon 2-10 werden gleichermaßen transkribiert und sind somit identisch in der Leber und der Beta-Zelle. Die gewebespezifischen Kontrollregionen sind mehr als 27 kb voneinander getrennt und beinhalten die Promotoren und das erste Exon. Die Initiierung der Transkription erfolgt beim Leber-Promotor an einem TATA-Box-Motiv 127 kb vom Translationsstartcodon entfernt (Magnuson *et al.* 1989). Der Beta-Zell-Promotor ist im Glucokinasegen aufwärts vom Leber-Promotor lokalisiert und die Transkriptionsinitiierung erfolgt ca. 400 kb vom Translationsstartcodon entfernt mit multiplen Startpunkten über einen Bereich von 62 Basen (Magnuson & Shelton 1989).

Die Glucokinase der Leber und der Beta-Zellen des Pankreas besteht aus 465 Aminosäuren, die lediglich an ihrem N-terminalen Ende in 11 Aminosäuren differieren, und sie besitzt einen isoelektrischen Punkt von 4,8 (Magnuson & Shelton 1989). Ein dreidimensionales molekulares Modell der humanen Glucokinase konnte anhand der Kristallstruktur der Hefe-Glucokinase, zu der die humane Glucokinase eine 33 %ige Homologie aufweist, bereits 1994 entworfen werden (St Charles *et al.* 1994). Eine kristallographische Analyse gelang erst 2004 und lieferte detaillierte Informationen über die Glucokinasestruktur und über die durch Substratbindung induzierte Konformationsänderung des Proteins (Abb. 1) (Kamata *et al.* 2004). Das Enzym besteht demnach aus zwei Domänen mit geringer Längendifferenz, die durch einen Spalt getrennt sind in dem sich das aktive Zentrum befindet und der wie ein Winkel aufklappbar ist. Es existieren mindestens zwei Konformationen der Glucokinase, bei

denen die Größe des Winkels zwischen den beiden Domänen variiert. Die Glucokinase konnte zunächst in ihrer aktiven geschlossenen Konformation (closed form) beschrieben werden, wobei die große und die kleinere Domäne dicht beieinander liegen. In dieser Konformation ist das Glucosemolekül über 6 Aminosäuren der beiden Domänen und der Verbindungsregion an die Glucokinase gebunden. Die zweite weit offene Konformation (super-open form) unterscheidet sich insbesondere in der Struktur der kleinen Domäne und in der Verbindungsregion von der geschlossenen Konformation. In der weit offenen Konformation ist die Bindung des Substrats Glucose räumlich nicht möglich und das Enzym daher inaktiv. Die Glucokinase unterscheidet sich durch diese starke Flexibilität von den anderen Hexokinase-Isoenzymen und liefert die Erklärung für die positive Kooperativität der Glucokinase (Cornish-Bowden & Storer 1986; Cardenas 1997). Es wird angenommen, dass neben diesen beiden Konformationen noch eine weitere offene Konformation (open form) der Glucokinase existiert, die in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration den Übergang zwischen den beiden beschriebenen Konformationen beeinflusst (Kamata *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2006).

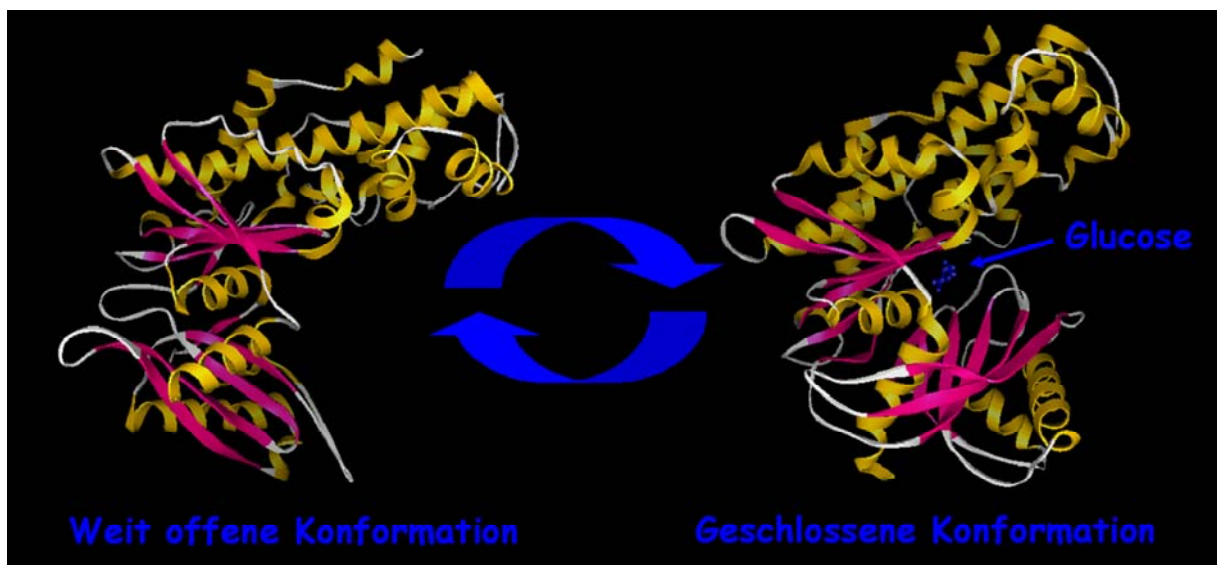


Abb. 1 Weit offene und geschlossene Konformation der Glucokinase

Bisher sind die zwei hier abgebildeten Konformationen des glucosephosphorylierenden Enzyms Glucokinase bekannt. In der weit offenen Konformation, die sich insbesondere in der Struktur der kleinen Domäne und in der Verbindungsregion von der geschlossenen Konformation unterscheidet, ist eine Bindung der Glucose räumlich nicht möglich und das Enzym daher inaktiv. In der geschlossenen Konformation ist das Enzym aktiv und die Glucose ist am aktiven Zentrum gebunden.

1.3 Die glucoseinduzierte Insulinsekretion in Beta-Zellen

Die Blutglucosekonzentration wird im menschlichen Organismus zwischen 4 und 7 mmol/l konstant gehalten, um eine ausreichende Versorgung der glucoseabhängigen Organe wie Gehirn und Erythrozyten zu gewährleisten. Für diese Regulation ist neben katabol regulierten biochemischen Prozessen primär die bedarfsgerechte Sekretion des anabolen Hormons Insulin verantwortlich. Zur Aufrechterhaltung der Blutglucosehomöostase müssen die Beta-Zellen des Pankreas in der Lage sein, geringe Änderungen der Blutglucosekonzentration z.B. durch Nahrungsaufnahme sensitiv zu erfassen, mit einer entsprechenden Sekretion von Insulin zu reagieren und die Insulinbiosynthese dem Bedarf entsprechend zu regulieren (Abb. 2) (Lenzen 1992). Störungen dieser Stimulus-Sekretionskopplung, die auch als glucoseinduzierte Insulinsekretion bezeichnet wird, können Anzeichen der Entstehung eines Typ 2 Diabetes mellitus darstellen.

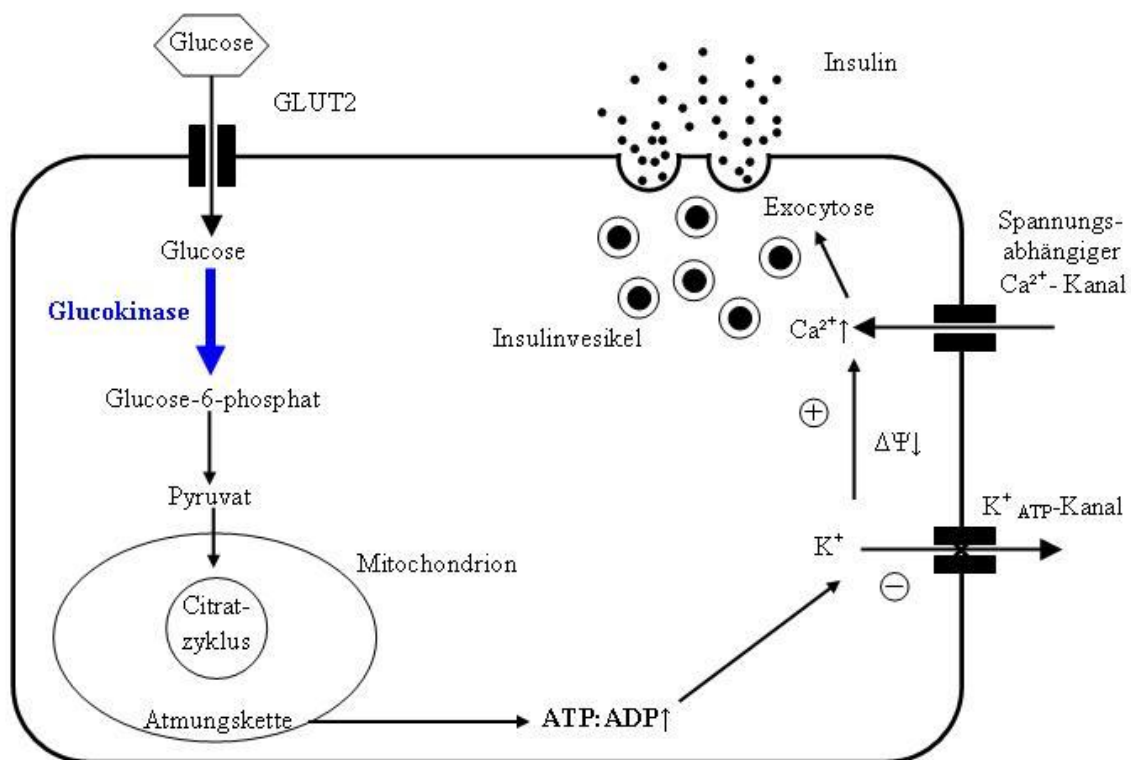


Abb. 2 Modell der glucoseinduzierten Insulinsekretion in der Beta-Zelle des Pankreas

Glucose wird in den Beta-Zellen des Pankreas und in der Leber durch den niedrigaffinen Glucosetransporter GLUT2 über erleichterte Diffusion aus dem Blut in die Beta-Zelle transportiert, so dass die extrazelluläre Glucosekonzentration der intrazellulären entspricht.

Dort findet im ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse eine Phosphorylierung der Glucose durch die Glucokinase statt, die hier als Glucosensensor fungiert und den Anstieg der extrazellulären Glucosekonzentration an glycolytische Fluxänderungen in der Beta-Zelle koppelt (Lenzen & Panten 1988; Matschinsky 1990; Lenzen 1992). Durch die nachfolgenden Reaktionen der Glykolyse, des Citratzyklus und der Atmungskette kommt es zu einem Anstieg des ATP/ADP-Quotienten. Dadurch werden die ATP-sensitiven Kaliumkanäle der Beta-Zelle geschlossen und die Plasmamembran wird depolarisiert. Durch diese Depolarisation der Zelle öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle und führen zum Einstrom von Calcium aus dem extrazellulären Raum in die Beta-Zelle, was die zytosolisch freie Calciumkonzentration erhöht und letztendlich die Exozytose und Sekretion der im Zytoplasma gespeicherten Insulingranula bewirkt.

1.4 Inhibitoren der Glucokinase

Mannoheptulose ist ein Monosaccharid und kann zu Zuckeralkoholen, die auch als acyclische Polyole oder Alditole bezeichnet werden, reduziert werden. Während bei Aldosen nur ein Reduktionsprodukt gebildet wird, können bei einer Reduktion von Ketosen zwei Zuckeralkohole entstehen. In Abbildung 3 sind die Heptulosen Mannoheptulose und Sedoheptulose mit ihren zugehörigen Zuckeralkoholen (Heptitole) dargestellt, die aus natürlichen Quellen isoliert werden können (Loewus F. A. 1982). Mannoheptulose wurde in Verbindung mit ihren zugehörigen Zuckeralkoholen Perseitol und Volemitol aus der Avocado isoliert. Sedoheptulose ist hingegen mit ihren Zuckeralkoholen Volemitol und β -Sedoheptitol in Sedum-Arten, die zur Familie der Dickblattgewächse zählen, enthalten. Sedoheptulose ist ein Zwischenprodukt der Photosynthese und ist somit als Zwischenprodukt des C3-Weges in photosynthetisch aktiven Pflanzen vorhanden (Richtmyer 1970). Durch die Beobachtung, dass hoher Avocado-Konsum beim Menschen zu einem Auftreten von Glucose im Harn bzw. zu einer Hyperglykämie führen kann, erhielt der ungewöhnliche C7-Zucker Mannoheptulose eine besondere Bedeutung für das Verständnis des Zuckerabbaus im menschlichen Organismus (Blatherwick *et al.* 1940).

In den Beta-Zellen des Pankreas wird neben der Glucose die Hexose Mannose von der Glucokinase phosphoryliert. Die Heptulose Mannoheptulose dagegen wird aufgrund ihrer Struktur zwar von der Zuckerbindungsstelle der Glucokinase gebunden, hingegen aber nicht von der Glucokinase phosphoryliert. Dies führt zu einer kompetitiven Hemmung der Glucokinaseenzymaktivität. Diese Inhibierung führte sowohl an isolierten Pankreas-Inseln als auch *in vivo* zu einer selektiven Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion (Lenzen

1992). Nach Injektion von Mannoheptulose konnte ein mehrere Stunden andauernder Anstieg der Blutglucosekonzentration beobachtet werden. Weiterhin erwies sich der Inhibitor Mannoheptulose zur Charakterisierung des komplexen Mechanismus der Regulation der Glucokinaseenzymaktivität in Beta-Zellen des Pankreas als sehr geeignet (Tiedge *et al.* 1999).

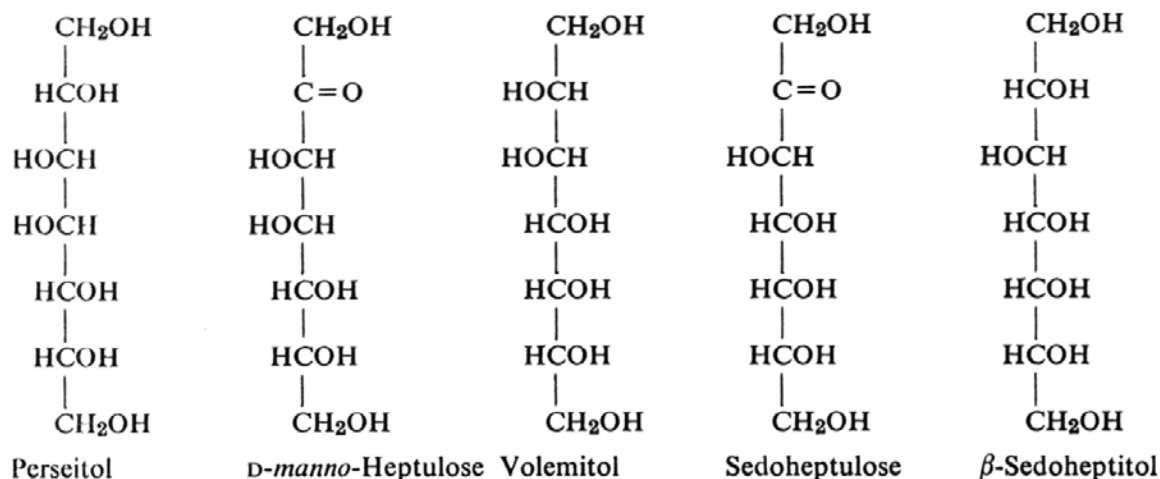


Abb. 3 C₇-Zucker mit ihren zugehörigen Zuckeralkoholen (Richtmyer 1970)

D-Mannoheptulose kann zu den zwei Zuckeralkoholen Perseitol (D-glycero-D-galacto-heptitol) und Volemitol (D-glycero-D-manno-heptitol) reduziert werden. Die zugehörigen Zuckeralkohole der Sedoheptulose sind β-Sedoheptitol und ebenfalls Volemitol.

Zudem stellen die Zucker D-Glucosamin und N-Acetyl-Glucosamin, die aufgrund ihrer Struktur im Glucosestoffwechsel nicht phosphoryliert werden können, bekannte kompetitive Inhibitoren der Glucokinase dar. Auch die diabetogenen Substanzen Alloxan und Ninhydrin hemmen die Glucokinase durch eine Interaktion mit den SH-Gruppen, jedoch irreversibel (Lenzen *et al.* 1987; Lenzen & Panten 1988; Lenzen 1992; Tiedge *et al.* 1997; Tiedge *et al.* 2000).

Endogen wird die Glucokinase allerdings nur in der Leber und nicht in den Beta-Zellen des Pankreas durch ein spezifisches Glucokinase Regulatorprotein in Abhängigkeit von Fructose-1-phosphat und Fructose-6-phosphat durch Hemmung der Enzymaktivität moduliert. Dieses Protein nimmt weiterhin entscheidenden Einfluss auf den für die Leber nachgewiesenen, aber noch nicht vollständig aufgeklärten, glucoseabhängigen Translokationsprozess der Glucokinase zwischen Zytoplasma und Nukleus (van Schaftingen *et al.* 1997; Baltrusch *et al.* 2005).

1.5 Aktivatoren der Glucokinase

Das Enzym 6-Phosphofructo-2-kinase/Fruuctose-2,6-bisphosphatase konnte als endogener aktivierender Interaktionspartner der Glucokinase identifiziert werden, der sowohl in der Leber als auch in den Beta-Zellen des Pankreas exprimiert wird (Baltrusch *et al.* 2001). Die Bindung der Glucokinase an die 6-Phosphofructo-2-kinase/Fruuctose-2,6-bisphosphatase wird über die Bisphosphatasedomäne vermittelt und führt zu einer Steigerung der maximalen Katalysegeschwindigkeit der Glucokinase (Massa *et al.* 2004). Es konnte in Beta-Zellen gezeigt werden, dass die Assoziation zwischen beiden Enzymen nach einem Anstieg der Glucosekonzentration zu einem verbesserten metabolischen Stimulus der glucoseinduzierten Insulinsekretion führt (Baltrusch *et al.* 2006).

Da der Erfolg der bisherigen nicht-pharmakologischen (Schulung, Lebensstiländerung, Ernährung und Bewegung) und pharmakologischen (Metformin, Sulfonylharnstoffen, Insulin, Alpha-Glukosidasehemmern, Gliniden, DPP-4 Inhibitoren, Glitazonen oder GLP-1-Rezeptoragonisten) Therapien für Typ 2 Diabetes Patienten begrenzt ist, steht die Erforschung neuer Arzneistoffe im Fokus der internationalen Diabetesforschung. Dabei stellt die Glucokinase als Glucosesensor eine sehr vielversprechende Zielstruktur dar. In 2003 wurde erstmals ein chemischer Glucokinase-Aktivator publiziert, dem bis heute weitere folgten (Grimsby *et al.* 2003; Brocklehurst *et al.* 2004; Efanov *et al.* 2005). Diese im Gegensatz zur 6-Phosphofructo-2-kinase/Fruuctose-2,6-bisphosphatase kleinen Moleküle binden spezifisch an eine Region der Glucokinase, die dem katalytischen Zentrum gegenüberliegt. Die synthetisierten allosterischen Aktivatoren der Glucokinase sind in der Lage, die glucoseinduzierte Insulinsekretion in den Beta-Zellen des Pankreas und die Glycogensynthese in der Leber zu steigern und somit eine erhöhte Blutglucosekonzentration zu normalisieren (Leighton *et al.* 2005; Printz & Granner 2005; Guertin & Grimsby 2006; Matschinsky 2009). Da die Aktivierung der chemischen Aktivatoren hauptsächlich über eine Steigerung der Affinität der Glucokinase zum Substrat Glucose erreicht wird und damit ein Anstieg der glucoseinduzierten Insulinsekretion bereits bei niedrigen Glucosekonzentrationen erfolgt, kann das Risiko einer Hypoglykämie in der therapeutischen Anwendung nicht ausgeschlossen werden. Eine Weiterentwicklung der chemischen Aktivatoren der Glucokinase ist daher notwendig.

1.6 Glucolipotoxizität insulinproduzierender Beta-Zellen

Beim Typ 2 Diabetes mellitus handelt es sich um eine heterogene Erkrankung, die sowohl durch eine gestörte glucoseinduzierte Insulinsekretion als auch durch eine Insulinresistenz der Zielorgane hervorgerufen wird. Eine genetische Prädisposition für den Typ 2 Diabetes mellitus gilt als gesichert. Im fortschreitenden Verlauf der Krankheit kommt es zu einem chronisch erhöhten Blutglucosespiegel, der bei unzureichender Therapie zu mikro- und makrovaskulären Schäden und damit final zu Durchblutungsstörungen, Erblindung, Nierenversagen und Herzinfarkt führt. Die nicht-enzymatische Glykierung von Gewebeproteinen spielt dabei eine nicht unwesentliche Rolle. Weiterhin ist der Typ 2 Diabetes mellitus mit anderen metabolischen Erkrankungen vergesellschaftet, insbesondere der Adipositas. Dadurch sind die Beta-Zellen neben der erhöhten Glucosekonzentration einer chronisch erhöhten Konzentration an freien Fettsäuren ausgesetzt.

Es wird daher diskutiert, ob eine erhöhte freie Fettsäurekonzentration oder eine erhöhte Glucosekonzentration alleine oder aber synergistisch zu einer Funktionsstörung der Beta-Zellen und zum Beta-Zell-Verlust führen. Während die Beta-Zell Lipotoxizität weithin als akzeptiert gilt (Cnop 2008), wird sowohl die Glucotoxizität als auch die Verstärkung der Lipotoxizität durch Glucose in Form einer Glucolipotoxizität kontrovers diskutiert (Cnop *et al.* 2001). Dabei gilt es zwischen einer *in vivo* Toxizität, bei der die Beta-Zellen neben Glucose und freien Fettsäuren auch Mediatoren des Fettgewebes wie zum Beispiel dem Adiponectin ausgesetzt sind und *in vitro* Untersuchungen an isolierten Beta-Zellen und insulinproduzierenden Zellen zu unterscheiden (Poitout 2008).

An Zellmodellen konnte insbesondere die Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) durch gesättigte Fettsäuren in unterschiedlichen Studien gezeigt werden (Cnop 2008). Dabei wird einer Überlastung des Proteinsyntheseprozesses im Endoplasmatischen Retikulum (ER), welche auch als ER-Stress bezeichnet wird, eine bedeutende Rolle zugesprochen (Cnop 2008). Zudem wurde ein Funktionsverlust der Beta-Zellen in Form einer reduzierten Glucoseoxidation, einer herabgesetzten glucoseinduzierten Insulinsekretion und einer Verminderung der Insulinbiosynthese als Folge der Exposition mit freien Fettsäuren berichtet (Bollheimer *et al.* 1998; Kelpe *et al.* 2003). Die gesteigerte Aufnahme von Lipoproteinen durch die Beta-Zelle scheint über eine Steigerung der Produktion von freien Sauerstoffradikalen (ROS, reactive oxygen species) ebenfalls einen zelltoxischen Einfluss zu haben (Cnop *et al.* 2002). Durch Glucose und freie Fettsäuren liegt ein hohes Nährstoffangebot der Zelle vor, das unweigerlich mit einem gesteigerten Elektronentransport

innerhalb der Atmungskette der Mitochondrien einhergeht. Ein Anstieg an ROS ist dabei wahrscheinlich und könnte als mögliche Erklärung für eine Glucolipotoxizität dienen. Die Beta-Zellen sind durch ihre unzureichende enzymatische Ausstattung an cytoprotektiven Enzymen sehr empfindlich gegenüber freien Sauerstoffradikalen (Tiedge & Lenzen 1996; Tiedge *et al.* 1998). Damit kommt der Untersuchung des mitochondrialen Beta-Zell-Stoffwechsels und seiner Kopplung an den Glucosemetabolismus eine besondere Bedeutung zu (Malmgren *et al.* 2009).

Experimentelle Daten zur Glucotoxizität in Beta-Zellen sind kontrovers. Da die Glucokinase durch ihre Glucosensorenfunktion der zentrale Regulator der Glykolyse in Beta-Zellen ist, wurde sie als Mediator der Glucotoxizität postuliert (Wang & Iyenedjian 1997; Faradji *et al.* 2001; Brock *et al.* 2002). In anderen Studien wurde ihr dagegen keine Rolle in der Glucotoxizität zugeschrieben (Cockburn *et al.* 1997; Olofsson *et al.* 2007). Eine Glucotoxizität wurde in Beta-Zellen des Pankreas nach chronischer Exposition mit hohen Glucosekonzentrationen beobachtet. Die Störungen der physiologischen Zellfunktion gingen mit einer reduzierten Glucokinaseexpression einher und führten schließlich zum Zelltod (Wu *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005; Kooptiwut *et al.* 2005). Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie ein protektiver Effekt der Beta-Zelle durch Exposition mit hohen Glucosekonzentrationen postuliert, wobei eine gesteigerte Synthese antiapoptotische Proteine in primären Inseln der Ratte beobachtet wurde (Hoorens *et al.* 1996).

Es lässt sich daher zusammenfassen, dass ein molekularer Mechanismus der Glucosetoxizität bis heute nicht beschrieben werden konnte. Vielmehr wird als Folge der Adaption an den erhöhten Glucosespiegel eine durch Anreicherung von Stoffwechselintermediaten hervorgerufene zelluläre Dysfunktion bis hin zum Zellverlust postuliert. Somit ist in Beta-Zellen des Pankreas weder der toxische Effekt einer erhöhten Glucosekonzentration noch die Rolle der Glucokinase in diesem Prozess bislang experimentell gesichert.

1.7 Der mitochondriale Stoffwechsel in Beta-Zellen

Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umschlossene hochdynamische Zellorganellen und liefern fast die gesamte benötigte intrazelluläre Energie durch Reaktionen des katabolen Stoffwechsels in Form von ATP. Über den katabolen Stoffwechsel wird nach dem Prinzip der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) den aufgenommenen Nahrungsbestandteilen über spezifische Enzyme (Dehydrogenasen) schrittweise Wasser entzogen und zur Energiegewinnung bis zum Kohlendioxid oxidiert. In den Mitochondrien finden die wichtigsten oxidativen Stoffwechselprozesse wie der Citrat-Zyklus und die Beta-Oxidation

von Fettsäuren statt. Das dabei gebildete NADH wird direkt in den Redoxsystemen der Atmungskette, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, oxidiert und führt final zur ATP-Synthese. Durch die freiwerdende Energie aus der schrittweisen Übertragung der Elektronen in den Atmungskettenkomplexen von den Reduktionsäquivalenten bis auf den Sauerstoff werden Protonen über die innere Mitochondrienmembran gepumpt. Dadurch entsteht ein elektrochemischer Protonengradient ($\Delta\mu_H$), der wiederum aus der Konzentrationsdifferenz der H^+ -Ionen (Δp_H) und dem Ladungsunterschied, dem mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\psi_m$) gebildet wird. Der Protonengradient liefert die Energie für die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat mittels der ATP-Synthase. Somit ist die ATP-Synthase über einen elektrochemischen Protonengradienten an den Elektronentransport gekoppelt (Abb.4).

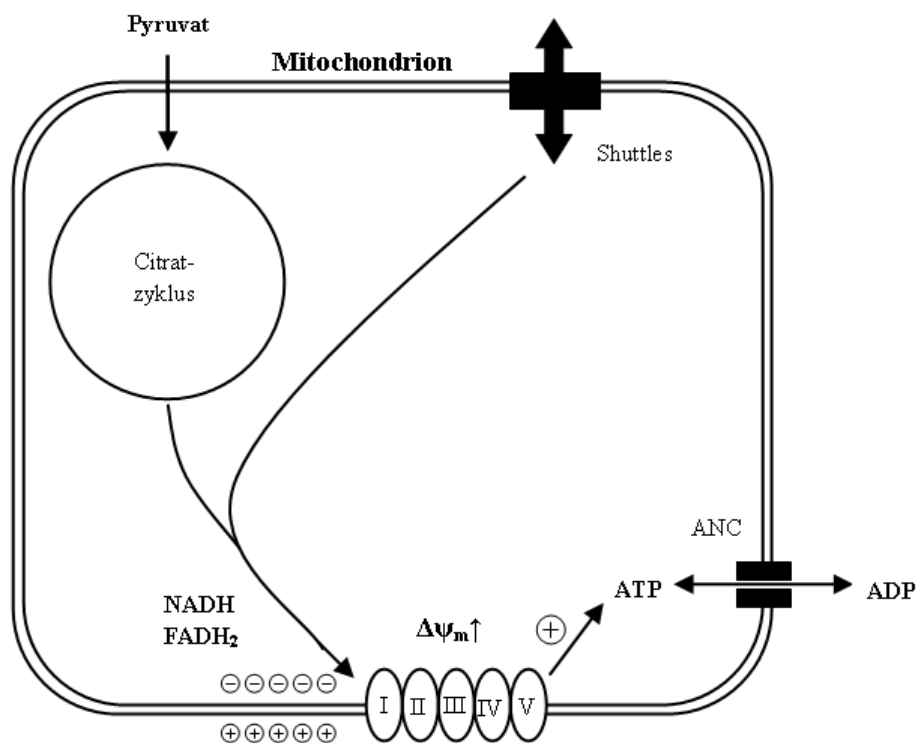


Abb. 4 Der mitochondriale Stoffwechsel

Die Shuttles können der Glycerophosphat- oder der Malat-Aspartat-Shuttle sein und transportieren NADH vom Cytosol in das Mitochondrium. Die Atmungskettenkomplexe I, II, III, IV und V übertragen die Elektronen des Wasserstoffs und pumpen Protonen über die innere Mitochondrienmembran, wodurch die freiwerdende Energie in Form eines mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) gespeichert wird. Der elektrogene Adeninnucleotidcarrier (ANC) tauscht ADP, das durch ATP-verbrauchende Prozesse im Cytoplasma entstanden ist, gegen ATP aus der mitochondrialen Matrix.

Während des oxidativen Stoffwechsels werden in den Mitochondrien unweigerlich auch ROS gebildet, die den zellulären Alterungsprozess fördern. Dies trägt zur Entstehung

unterschiedlicher Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Gefäßerkrankungen, Krebs und einigen neurologischen Erkrankungen bei. Das Hämprotein Cytochrom c ist im Intermembranraum lokalisiert und wird durch eine Schädigung der äußeren Membran ins Cytosol freigesetzt und löst dadurch die Aktivierung einer Kaskade von Caspasen aus, die die Apoptose zur Folge haben (Kuznetsov & Margreiter 2009). In insulinproduzierenden Beta-Zellen kann eine mitochondriale Dysfunktion zum Diabetes Mellitus führen, da die mitochondriale ATP-Produktion für die Insulinsekretion der Beta-Zellen unabdingbar ist. In anderen Zelltypen, wie Muskel- oder Fettzellen, wird ein Zusammenhang zwischen einer Schädigung der Mitochondrien und der beim Diabetes Mellitus auftretenden Insulinresistenz in diesen peripheren Geweben diskutiert. Auch einige neurodegenerative Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer und Multiple Sklerose stehen mit Mutationen der mitochondrialen Proteine im Zusammenhang (Duchen 2004; Wikstrom *et al.* 2007).

Zur mikroskopischen Analyse des Membranpotentials können die sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe Tetramethylrhodamin Ethyl Ester Perchlorat (TMRE) oder JC-1 sowie die Autofluoreszenz bestimmter Proteine verwendet werden. (Kuznetsov *et al.* 2004; Wikstrom *et al.* 2009). Der rote Fluoreszenzfarbstoff TMRE ist ein lipophiles membranpermeables Kation, das in der inneren Mitochondrienmembran sehr schnell und reversibel in Abhängigkeit von der Höhe des Membranpotentials bindet. Je höher das Membranpotential ist, desto stärker akkumuliert der Farbstoff in den Mitochondrien, dessen Rotfluoreszenz bei 514 nm angeregt und bei 550 nm detektiert wird. Für eine spezifische Detektion der Mitochondrien kann der Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Green eingesetzt werden, um unabhängig vom Membranpotential alle Mitochondrien bei 520 nm zu detektieren. Durch die reversible Bindung des Farbstoffs TMRE und die Gegenfärbung mit MitoTracker Green ist ein Anstieg bzw. eine Verminderung des Membranpotentials über die Zeit anhand der Zu- und Abnahme der Ratio beider Fluoreszenzintensitäten in lebenden Zellen messbar (Loew *et al.* 1993; O'Reilly *et al.* 2003; Wikstrom *et al.* 2007).

Das mitochondriale Membranpotential der einzelnen Mitochondrien einer Zelle kann stark variieren, so dass Mitochondrien mit unterschiedlicher metabolischer Aktivität und Funktion innerhalb einer Zelle existieren. Dieses Phänomen, das auch als Heterogenität bezeichnet wird, wurde bereits in unterschiedlichen Zelltypen wie Herzmuskelzellen, Leberzellen und Krebszelllinien beobachtet (Kuznetsov *et al.* 2004). Auch in isolierten Beta-Zellen und intakten Langerhans'schen Inseln von Mäusen konnte eine Heterogenität des mitochondrialen Stoffwechsels anhand mitochondrialer Subpopulationen mit unterschiedlich hohem Membranpotential nachgewiesen werden (Wikstrom *et al.* 2007). Bisher gibt es keine

einheitliche Definition des Begriffs der mitochondrialen Heterogenität, da sich die Heterogenität auf das Verhalten der gesamten Zelle im Vergleich zu anderen Zellen oder auf die Mitochondrien innerhalb einer Zelle beziehen kann. Auch kann eine „mitochondriale Heterogenität“ anhand folgender Parameter gemessen werden: 1) Die Morphologie der Mitochondrien von kleinen, rundlichen einzeln vorliegenden Formen bis hin zu langen dünnen Filamenten mit netzwerkartigen Verzweigungen. 2) Die funktionellen Eigenschaften bezüglich des Redoxstatus, des Membranpotentials, der Zellatmung und des Calcium- oder ROS-Gehalts. 3) Das mitochondriale Verhalten nach der Zugabe von Substraten oder Inhibitoren oder der Reaktion auf oxidativen Stress oder auf mangelnde Nährstoffversorgung. 4) Die Dynamik der Mitochondrien durch Fission- und Fusion- Ereignisse oder Verlängerungen und Verkürzungen der Filamente (Kuznetsov & Margreiter 2009).

Isolierte Beta-Zellen der Maus zeigten nach Glucosestimulation ein heterogenes Verhalten bezüglich des Anstiegs des Membranpotentials. Ein maximaler Anstieg des mitochondrialen Membranpotentials wurde in 5 % der Zellen bereits nach einem Glucose Stimulus von 8 mmol/l festgestellt, während 18 % der Zellen bei einer weiteren Erhöhung auf 12 mmol/l Glucose und der Hauptanteil der Zellen erst bei 16 mmol/l Glucose ihr maximales Membranpotential erreicht, womit eine Heterogenität im Verhalten von Beta-Zellen gezeigt wurde (Heart *et al.* 2006). Der Begriff „dynamische Heterogenität“ bezeichnet das Verhalten der Mitochondrien im zeitlichen Verlauf z.B. nach einer Substratzugabe (Kuznetsov *et al.* 2004).

1.8 Funktion der Mitochondriendynamik in Beta-Zellen

Die Analyse der Morphologie der Mitochondrien rückt immer mehr in den Fokus der Forschung, da sie nicht nur durch die mitochondriale Funktion geprägt wird, sondern diese auch beeinflusst (Willems *et al.* 2009). Die Morphologie der Mitochondrien variiert stark in Abhängigkeit vom Zelltyp und ihrer metabolischen Aktivität. So können Mitochondrien lange dünne fadenartige Strukturen annehmen. Diese können verzweigt sein und dadurch regelrechte Netzwerke ausbilden. Jedoch können Mitochondrien auch sehr kurz sein und als einzelne punktförmige Körnchen zufällig verteilt in einem fragmentierten Zustand vorliegen (Chen & Chan 2004; Kuznetsov *et al.* 2004; Rossignol & Karbowski 2009). In adulten Herzmuskelzellen und Skelettmuskelzellen liegen die Mitochondrien sogar in parallelen Reihen und somit in einer speziellen festen Anordnung und örtlich fixiert vor. Diese Anordnung in Muskelzellen ist von der intrazellulären Lokalisation der Mitochondrien abhängig. Die Mitochondrien in Muskelzellen sind bereits durch ihr unterschiedliches Aussehen deutlich in die drei Gruppen intermyofibrillar, subsarcolemmal und perinuclear

einteilbar, die auch auf unterschiedliche Funktionen im intrazellulären Metabolismus spezialisiert sind (Kuznetsov *et al.* 2004; Kuznetsov *et al.* 2009). Durch weitere Studien deutet sich an, dass die Unterschiede in der Form, Beweglichkeit und der intrazellulären Anordnung der Mitochondrien in der organspezifischen Spezialisierung der Zellen begründet sind (Rizzuto *et al.* 1998; De Giorgi *et al.* 2000; Chen *et al.* 2003; Bruce *et al.* 2004; Kuznetsov *et al.* 2009; Kuznetsov & Margreiter 2009).

Die Morphologie der Mitochondrien und somit auch ihre Anzahl innerhalb einer Zelle hängt sehr stark von der Dynamik der Mitochondrien ab und ist einer dauernden Veränderung unterworfen, die durch die zwei gegenläufigen Prozesse Fission und Fusion reguliert wird und dadurch gravierend die mitochondriale Funktion beeinflusst (Chen & Chan 2004; Kuznetsov & Margreiter 2009; Rossignol & Karbowski 2009). Bei dem Prozess der Fission findet eine Teilung eines Mitochondriums in zwei eigenständige Mitochondrien statt, während sich bei der Fusion zwei Mitochondrien zu einem verschmelzen (Abb. 5). Jedoch können auch Fission Events in einem mitochondrialen Netzwerk eintreten, die zu keiner kompletten Fragmentierung des Netzwerkes führen, sondern die Morphologie durch anschließende Fusionen kaum verändern (Twig *et al.* 2006).

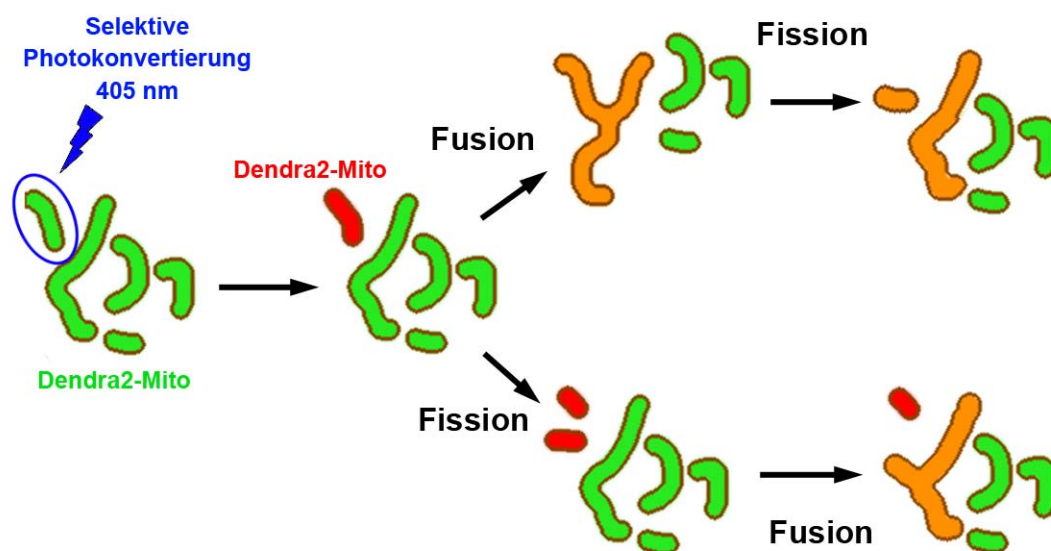


Abb. 5 Schematische Darstellung der dynamischen Prozesse der Mitochondrien

Die mitochondriale Dynamik in einer Dendra2Mito-transfizierten Zelle kann über die Verteilung des nach der selektiven Photokonvertierung roten Fluoreszenzfarbstoffs am Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Die Verteilung des Farbstoffs in den Mitochondrien durch Fusion und Fission ist anhand der zwei möglichen Wege verdeutlicht. Der Prozess der Fusion führt zu einer Abschwächung der Intensität der roten Fluoreszenz und zu einer Ausbreitung des Farbstoffs im fusionierten Mitochondrium. Eine Fission des rot fluoreszierenden Mitochondriums hat zwei Tochtermitochondrien mit identischer Intensität der roten Fluoreszenz zur Folge.

In den letzten Jahren wurden einige mitochondriale Proteine identifiziert, die einen starken Einfluss auf die Fission und Fusion besitzen und für eine Balance dieser beiden Prozesse sorgen (McBride *et al.* 2006). Vor allem die Proteine Mitofusin-1 (Mfn1) und Mitofusin-2 (Mfn2), die in der äußeren Mitochondrienmembran verankert sind und das Protein Optic Atrophy-1 (OPA1), das vorwiegend in der inneren Mitochondrienmembran aber auch im Intermembranraum lokalisiert ist, regulieren in Säugetierzellen die Fusion der Mitochondrien (Olichon *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003; Chen & Chan 2004). An der Regulation der Fission in Säugetierzellen sind vorwiegend die Proteine Dynamin-related protein 1 (DRP-1) (Smirnova *et al.* 2001) und hFis1 (Yoon *et al.* 2003) beteiligt, die peripher und in der äußeren Mitochondrienmembran vorliegen (Chen & Chan 2004; McBride *et al.* 2006).

Mit Hilfe neu entwickelter photoaktivierbarer und photokonvertierbarer Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. PA-GFP (Patterson & Lippincott-Schwartz 2002) und Dendra2 (Gurskaya *et al.* 2006; Chudakov *et al.* 2007b), die im fluoreszenzmikroskopischen Live-Cell-Imaging eingesetzt werden können, kann eine Echtzeitanalyse intrazellulärer Bewegungen erfolgen. Dabei wurden bereits Zellorganellen wie Mitochondrien und Transportvesikel als auch Membranfilamente markiert (Twig *et al.* 2006; Chudakov *et al.* 2007a; Baltrusch & Lenzen 2008). Durch die Anwendung dieser Fluoreszenzfarbstoffe wurde eine Markierung einzelner Mitochondrien, ihre nachfolgende Verfolgung und eine Analyse der Fission und Fusion Prozesse anhand der Verteilung des Farbstoffs auf weitere Mitochondrien möglich (Abb. 5 und 6) (Twig *et al.* 2006; Twig *et al.* 2008a).

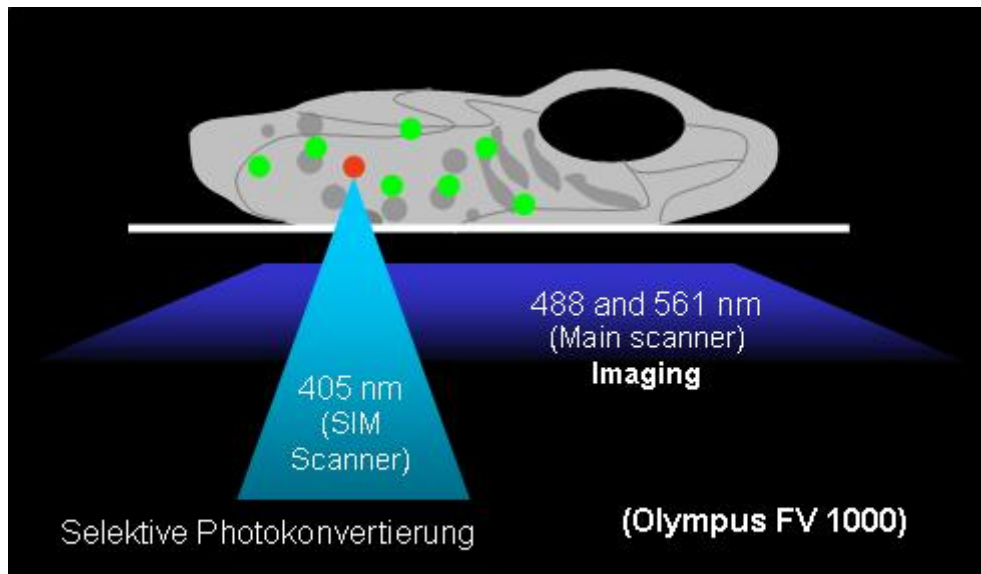


Abb. 6 Selektive Photokonvertierung am Fluoreszenzmikroskop

Dargestellt ist die Anregung und Detektion (Main Scanner) der grünen und roten Fluoreszenz der Mitochondrien in einer lebenden Zelle und die Photokonvertierung (SIM Scanner) eines Mitochondriums am Fluoreszenzmikroskop (Olympus FV 100). Die Transfektion einer Zelle mit Dendra2Mito resultiert in grün fluoreszierenden Mitochondrien (●). Durch die selektive Photokonvertierung eines einzelnen Mitochondriums in einer Zelle mit Laserlicht bei 405 nm kann das nun rot fluoreszierende Mitochondrium (●) gezielt analysiert werden.

Der Teilungsprozess eines Mitochondriums in zwei Tochtermitochondrien wurde in COS7-Zellen durch eine simultane Markierung der Mitochondrien mit photoaktivierbarem GFP (PA-GFP) und TMRE genau untersucht und festgestellt, dass eine Teilung nicht immer, jedoch in den meisten Fällen zu Tochtermitochondrien mit differierendem Membranpotential führt. Daher resultiert aus einer Fission des Mitochondriums meist ein de- und ein hyperpolarisiertes Tochtermitochondrium, wobei sich das Membranpotential nach einer Depolarisierung wieder regenerieren kann (Twig *et al.* 2008a).

Anhand einer simultanen Markierung der Mitochondrien mit PA-GFP und TMRE konnte in INS-1-Zellen und primären Beta-Zellen der Maus eine selektive Fusion der Mitochondrien gezeigt werden. Etwa ein Drittel der INS-1-Zellen besitzen mitochondriale Subpopulationen, die keine Fusionen eingehen. Diese nicht fusionierenden Mitochondrien weisen im Vergleich zum durchschnittlichen mitochondrialen Membranpotential der gesamten Zelle ein verringertes Membranpotential auf (Twig *et al.* 2008a).

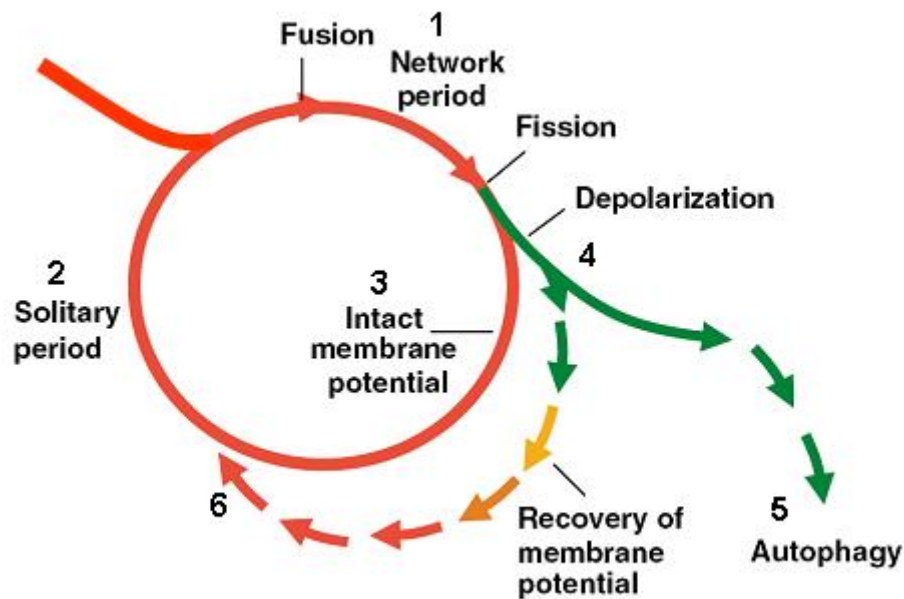


Abb. 7 Modell des Lebenszyklus der Mitochondrien bzw. der Dynamik von Mitochondrien durch Fusion und Fission (Twig *et al.* 2008a)

Ein Mitochondrium durchläuft während der Dauer seines Lebens immer wieder den abgebildeten Zyklus, in dem sich die Prozesse der Fusion und Fission immer wieder abwechseln. Durch die Fusion zweier Mitochondrien gehen die Mitochondrien in die relativ kurze Network period (1) über und befinden sich in einer netzwerkwerkartigen Struktur. Die Fusion leitet den Prozess der Fission ein, der zu einer länger andauernden Solitary period (2) führt, in der die Mitochondrien einzeln vorliegen. Die Fission bringt meist ein Tochtermitochondrium mit intaktem Membranpotential (3) und ein depolarisiertes Mitochondrium (4) hervor. Das depolarisierte Mitochondrium kann entweder ein intaktes Membranpotential wiederherstellen und in die Solitary period übergehen (6), oder es wird nach einigen Stunden der Depolarisation durch Autophagie eliminiert (5).

Es wird ein durch Fusion- und Fission- Prozesse determinierter Lebenszyklus der Mitochondrien postuliert (Abb. 7). Die Mitochondrien verbleiben nur kurze Zeit (~100s bei INS-1- und COS7- Zellen) im Verschmelzungszustand, dem eine Netzwerk-Periode folgt. Es wird angenommen, dass die Fusion die Teilung der Mitochondrien einleitet, wodurch zwei meist ungleiche Tochtermitochondrien entstehen. Das depolarisierte Tochtermitochondrium kann entweder ein intaktes Membranpotential wiederherstellen oder verbleibt in einem depolarisierten Zustand, der die Autophagie des Mitochondriums zur Folge hat. Somit sind diese Prozesse eine Qualitätskontrolle der Mitochondrienpopulation, mit der die funktionell beschädigten Mitochondrien durch Autophagie eliminiert werden können und so eine Anreicherung dysfunktionaler Mitochondrien verhindert wird (Twig *et al.* 2008a; Twig *et al.* 2008b).

1.9 Fragestellung

Die Glucokinase kann millimolare Veränderungen der extrazellulären Glucosekonzentration an signalgebende glykolytische Fluxänderungen koppeln und stellt damit das Schlüsselenzym der glucoseinduzierten Insulinsekretion in Beta-Zellen des Pankreas dar. Ein toxischer Einfluss einer hohen extrazellulären Glucosekonzentration wird gemeinhin als Ursache einer Beta-Zell Funktionsstörung wie sie beim Typ 2 Diabetes mellitus vorliegt diskutiert. Aufgrund ihrer Rolle im Glucosestoffwechsel der Beta-Zelle könnte die Glucokinase an einem solchen Prozess beteiligt sein. Die Promotionsarbeit hatte daher folgende Ziele:

1. Ein Einsatz der Heptulose Mannoheptulose wurde erwogen, um eine Glucosetoxizität in den Beta-Zellen zu verhindern. Daher sollte die Funktion der Mannoheptulose als kompetitiver Inhibitor der Glucokinase weiter untersucht werden.
2. Es sollte eine insulinproduzierende Zelllinie generiert werden, in der die Glucokinase in einem physiologischen Bereich regulierbar exprimiert wird. Hierzu sollte die Ratteninsulinomzelllinie RINm5F verwendet werden. Dabei sollte mit dem Rheoswitch-System ein neues Expressionssystem verwendet werden, welches einen synthetischen Induktor verwendet.
3. Die Glucokinaseexpression in den RINm5F-Zellen sollte als Fusionsprotein mit dem Fluoreszenzprotein EYFP erfolgen. Dadurch sollte in den Zellen nachfolgend eine direkte Korrelation von Glucokinaseexpression, Glucokinase Enzymaktivität, der glucoseinduzierten Insulinsekretion und der Zellvitalität ermöglicht werden.
4. Bedingungen einer Glucotoxizität und Glucolipotoxizität sollten durch eine Langzeitinkubation von bis zu 14 Tagen mit Glucose und Palmitinsäure in der generierten RINm5F-Zelllinie erreicht werden. Dabei sollte durch Vitalitätsanalysen insbesondere untersucht werden, welchen Einfluss die Höhe der Glucokinaseexpression auf diesen Mechanismus besitzt.
5. Zur Gewährleistung der glucoseinduzierten Insulinsekretion in den Beta-Zellen ist ein intakter mitochondrialer Stoffwechsel von besonderer Bedeutung. Gleichzeitig ist es denkbar, dass hier oder in der fehlenden Kopplung an den zytoplasmatischen Glucosemetabolismus das Signal für eine Glucosetoxizität entsteht. Daher sollte der Anstieg des mitochondrialen Membranpotentials auf einen Glucosestimulus hin sowie die mitochondriale Dynamik in der RINm5F-Zelllinie und primären Beta-Zellen der Ratte nach Exposition mit einer erhöhten Glucosekonzentration untersucht werden.

2 Publikationen

Titel:

Combination of biotransformation and chromatography for the isolation and purification of mannoheptulose

Zeitschrift:

Biotechnology Journal 2007, 2, 692–699.

Titel:

Activation of glucokinase by the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and the chemical compound LY2121260

In Vorbereitung.

Titel:

Glucokinase mediates coupling of glycolysis to the mitochondrial metabolism but not beta-cell damage at high glucose exposure

In Vorbereitung.

Combination of biotransformation and chromatography for the isolation and purification of mannoheptulose

**Nathalie Kappler-Tanudyaya^{1,*}, Heike Schmitt^{2,*}, Nils Tippkötter¹, Lina Meyer³,
Sigurd Lenzen², Roland Ulber^{1,**}**

¹Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik, Technische Universität Kaiserslautern,
Gottlieb-Daimler-Straße, 67663 Kaiserslautern, Germany

²Institut für Klinische Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1,
30625 Hannover, Germany

³Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, Callinstr. 3, 30167 Hannover,
Germany

*These authors made an equal contribution to this study

**Corresponding author:

Prof. Dr. Roland Ulber
Technische Universität Kaiserslautern
Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik
Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik
Gottlieb-Daimler-Straße
67663 Kaiserslautern
Fax.: ++49 631 205 4312
E-Mail: Ulber@mv.uni-kl.de

Abstract

Mannoheptulose is a seven-carbon sugar. It is an inhibitor of glucose-induced insulin secretion due to its ability to selectively inhibit the enzyme glucokinase. An improved procedure for mannoheptulose isolation from avocados is described in this study (based upon the original method by La Forge). The study focuses on the combination of biotransformation and downstream processing (preparative chromatography) as an efficient method to produce a pure extract of mannoheptulose. The experiments were divided into two major phases. In the first phase, several methods and parameters were compared in order to optimize the mannoheptulose extraction with respect to efficiency and purity. In the second phase, a mass balance of mannoheptulose over the whole extraction process was undertaken to estimate the yield and efficiency of the total extraction process. The combination of biotransformation and preparative chromatography allowed the production of a pure mannoheptulose extract. In a biological test, the sugar inhibited the glucokinase enzyme activity efficiently.

Keywords: Mannoheptulose, integrated bioprocess, downstream processing, diabetes

Abbreviations: DW: dry weight, MH: mannoheptulose, NADPH: nicotine amide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

1 Introduction

D-Mannoheptulose is classical inhibitor of glucose-induced insulin secretion [1] and glucose oxidation [2, 3] and a specific inhibitor of the glucose phosphorylating enzyme glucokinase in pancreatic beta cells and in liver cells [4, 5] due to its ability to compete with the physiological substrate glucose for the sugar-binding site of the enzyme [6]. Through its ability to inhibit insulin secretion from the pancreas, it can induce a diabetic metabolic state when applied to humans or animals. An anti-cancer potency of this heptulose has also been reported, most likely due to its ability to inhibit cell growth in cell types expressing glucokinase such as in liver tumour cells [7].

Mannoheptulose is commonly found in avocados (*Persea Americana*). This seven-carbon sugar was originally identified by La Forge as a major sugar component of this fruit [8]. Mannoheptulose has been found in other vegetables and fruits, such as alfalfa, fig, and primrose as well. However, high contents of mannoheptulose (up to 10% of the tissue dry weight) have been reported only in avocados [9]. Avocado extracts contain particularly high amounts of mannoheptulose and its related seven carbon sugar alcohol perseitol, comprising together about 50-90% of the total soluble sugars content [10]. Other sugars are glucose, fructose, sucrose and even starch. The mannoheptulose content in the plant material impacts directly the mannoheptulose amount released while the extraction. Previous studies on mannoheptulose content in avocados have shown widely varying amounts depending a lot on cultivar but also on degree of ripeness or whether the fruit was attached to the tree while ripening [10]. The Fuerte avocados used for the experiments contained only low amounts of mannoheptulose. Some other avocado cultivars contain high levels of mannoheptulose, like the cultivars Ile de France, Lula and Collinson with respectively 3.82%, 3.14% and 3.38% fresh weight mannoheptulose [12].

The extraction methods of mannoheptulose described in the literature are based on the good solubility of monosaccharides in aqueous solutions as well as the precipitation of proteins through heat denaturation or alcohol solutions. Several steps of filtration or centrifugation and concentration by evaporation of the extract are required before crystallisation of the sugars with organic solvents (mainly ethanol, methanol or acetic acid). The extraction of mannoheptulose from avocados was undertaken by La Forge [8] as follows: the avocado pulp was crushed and mixed with water in order to dissolve the sugars in solution. Thereafter the solution was separated from the pulp by filtration. Proteins were then precipitated using absolute ethanol. Several steps of volume concentration under diminished pressure were then undertaken until the sugar extract became a thick syrup containing mainly mannoheptulose and perseitol. The separation of mannoheptulose from perseitol was finally carried out by fractioned crystallisation under diminished temperature. The dried end product was described as a white crystalline powder. However, a long extraction period of approx. 8 days was required due to the time-consuming filtration steps.

Here we describe an improvement of this mannoheptulose extraction procedure. The study focuses especially upon a combination of biotransformation and downstream processing (preparative ion-exchange chromatography) as an efficient method to produce a pure extract of mannoheptulose. Due to the inefficient separation of mannoheptulose and glucose with commercially available ion exchange resins, glucose had to be biotransformed prior to the downstream process.

In a first step, several extraction methods were compared and different parameters were validated in order to optimize the mannoheptulose extraction procedure with respect to efficiency and purity. In a subsequent step, a mass balance of mannoheptulose over the whole extraction process was undertaken to estimate the yield and efficiency of the process.

2 Material and methods

2.1 Chemicals

D-mannoheptulose and perseitol were purchased from Glycoteam GmbH, Hamburg, Germany. All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, Munich, Germany or from Merck, Darmstadt, Germany.

2.2 Plant material

The avocados were purchased as available in grocery stores. Different lots of avocado varieties harvested in different seasons were used for mannoheptulose extraction during this work. Though varying in mannoheptulose concentration, the extraction procedure was applicable with all used samples. The optimisation of the mannoheptulose extraction parameters was carried out with an Ettinger variety of avocados. The final mass balance of mannoheptulose was performed with a Fuerte variety.

2.3 Mannoheptulose extraction method

The avocado flesh was grinded using a homogenizer and then divided into several 100 g portions. Each portion was suspended 1:2 (w/w) with distilled water and homogenised by mixing. Two different extraction methods were compared with respect to their ability to release mannoheptulose from the avocado cells. The first method is based on aqueous extraction by elevated temperature and the second on ultrasonic extraction.

Heat extraction

The avocado suspensions for the heat extraction were set to pH 4, 5, 6 or 7 by addition of HCl or NaOH and then extracted at 85 °C for 45 min, 3 or 6 h. A reference extraction at room temperature was carried out as well.

Ultrasonic extraction

For the ultrasonic extraction, the avocado suspensions were sonicated using an ultrasonic disintegrator (HD60-Sonoplus, Bandelin electronic, Berlin, Germany) under cooling on ice for 4 cycles of 1 min each with 30 s cooling intervals.

The avocado cells, flesh, pigments and oil were separated from the aqueous sugar extract through centrifugation at 4 °C and 6,740 g (centrifuge Hermle Z 383K) and then re-extracted identically 4 more times. In each extraction step, samples of the aqueous sugar extract were taken for RP-HPLC analysis.

2.4 Extract purification method

Biotransformation

The aqueous sugar extract contains all sugars of the avocado pulp, in particular mannoheptulose, perseitol, glucose and fructose as well as proteins and avocado cells' nucleotic material. The separation of glucose and mannoheptulose could not be completed efficiently using commercially available chromatographic systems since both compounds eluted at the same retention time. Therefore, the extract was treated with *Saccharomyces cerevisiae* prior to the chromatographic step to remove the hexoses glucose and fructose. The biotransformation was carried out in culture flasks while shaking at 100 rpm at 30 °C for 4 hours on a B. Braun Biotech International Certomat BS-T shaker. Yeast concentrations from

1.4 up to 18 gL⁻¹ (DW) were applied to the extracts in order to study kinetic effects on the glucose and fructose removal. The biotransformation was not performed under sterile conditions. During the incubations, 1.5 mL samples were taken from the suspensions every 15 min during the first hour and then at hourly intervals. The yeast cells were centrifuged at 13,000 g on a VWR Galaxy 16 DH model and the supernatant analysed via RP-HPLC or using an enzymatic assay for glucose and fructose.

Protein removal

After the glucose and fructose removal, proteins remaining in the extract were removed through precipitation with four volumes absolute ethanol. The slimy precipitation products were filtered using a blue ribbon filter (grade 589/3, 2 µm pore size) in a nutsch filter unit. The extract was concentrated under vacuum at 70 °C and 150 mbar using a rotary evaporator (Buechi, RE 111 Rotavapor). The protein content of the extract was determined using the standard Bradford protein assay. If necessary, the step of protein precipitation with absolute ethanol was repeated until the protein content did not exceed 0.4%.

Preparative chromatography

Mannoheptulose and perseitol remained the main compounds of the extract. They were separated by preparative chromatography using a strong acid Amberlite CR 1320 cation exchange matrix in Ca²⁺-form suitable for the separation of monosaccharides. The resin is widely used for sugar purification from foods and temperature resistant up to 120 °C, allowing elution at raised temperatures.

5-6 mL of a suspension containing 14.5 gL⁻¹ mannoheptulose was applied to the column, containing 180 g resin, and eluted with distilled water at a flow rate of 2.45, 5 or 7 mL min⁻¹.

The column was kept at 70 °C. Fractions of the eluent were collected in intervals of 2 min (corresponding to 4.9 mL volume fractions at 2.45 mL min⁻¹, 10 mL fractions at 5 mL min⁻¹ and 14 mL fractions at 7 mL min⁻¹) and subsequently analyzed by RP-HPLC. All fractions containing mannoheptulose were pooled, concentrated by evaporation at 70 °C and 150 mbar, and finally decolorized with activated carbon until the extract reached a pale yellow colour. Aliquots of the final extract were freeze dried for crystallisation under vacuum using a Juergens Martin Christ freeze dryer equipped with a Pfeiffer Balzers vacuum pump.

2.5 Analytical methods

Mannoheptulose and perseitol were quantified by RP-HPLC. Glucose and fructose were quantified either with an enzymatic test kit (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) or with RP-HPLC. Samples of the above extract were pre-treated for RP-HPLC analysis through addition of 2 to 4 volumes absolute ethanol in order to precipitate any remaining proteins and then filtered (0.45 µm pore size). Samples were analysed on a Techlab LC model (Erkerode, Germany) equipped with a refractive index detector Refracto Flow 60 (Sun Chrom, Friedrichsdorf, Germany) and a Reprosil Pur NH₂ 5 µm, 250 *4 mm column. 50 µL samples were injected into the column pre-heated at 30 °C. The mobile phase was acetonitrile-water (80:20, v/v). The flow rate was set at 1 mL min⁻¹. The peak areas were compared with a standard curve for each sugar.

Ionic residues in the freeze dried products were measured with an ion-chromatograph equipped with a Shimadzu COD-6A conductivity detector. Chloride anions were quantitatively analysed using an IC-512 analytical anion column from Shodex. A solution of 18.5 g boric acid, 0.249 g phthalic acid and 0.171 g Tris-amino-methane in 1 L HPLC-grade water was used as eluent.

The freeze dried products were analysed via $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy using a 400 MHz NMR Spectrometer (Bruker) for final identification. Spectra of the final products were compared to those of mannoheptulose and perseitol standards.

2.6 Glucokinase inhibition test

Glucokinase enzyme activity was determined as described [11] using recombinant human pancreatic beta cell glucokinase [6]. The principle of the enzymatic test is based on the phosphorylation of D-glucose by glucokinase. Under the presence of the enzyme Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase, the glucose-6-phosphate is converted into 6-phosphogluconlacton and NADPH, which can be measured photometrical at 340 nm. Without mannoheptulose, a glucokinase activity of 100% was detected. In presence of mannoheptulose, D-glucose cannot be phosphorylated by glucokinase and therefore no NADPH can be released.

3 Results

3.1 Parameter study on the mannoheptulose extraction efficiency

Several parameters and methods were analysed with respect to the efficiency of the mannoheptulose release during the extraction procedure. Figure 1 compares the different sugar concentrations of the avocado extract obtained from aqueous heat extraction at 25 and 85 °C and ultrasonic extraction. Whether the extraction method, pH, and extraction time neither the temperature had any major effect on the amount of mannoheptulose released. The average mannoheptulose concentration for the examined parameters was 3.96 gL⁻¹. The maximal deviation of the concentration occurred while changing the parameter pH and amounted to ± 0.22 gL⁻¹.

None of the cell disruption methods tested had an impact on the concentration of mannoheptulose released. Thus, it can be concluded that most of the cell disruption already occurred during the initial grinding step of the avocado flesh. The concentrations of the hexoses glucose and fructose in the extract were approximately 8 times lower than those of mannoheptulose and approximately 2 times lower than those of perseitol.

A total of 4 re-extractions at room temperature were performed. At each extraction step, the extract composition was analyzed through RP-HPLC. Figure 2 shows the amount of the sugars dissolved in the extract after each extraction step. After 5 extraction steps, a total of 1.04 g mannoheptulose was recovered in comparison to 0.45 g perseitol and approximately 0.2 g glucose and fructose. Thus, out of the initial 80 g of avocados, 1.3% (w/w) mannoheptulose, 0.6% (w/w) perseitol and 0.25% (w/w) glucose and fructose have been extracted. After the fourth extraction step, a saturation of the extracted sugar was achieved and 99.4% of the total sugar was recovered. The total sugar yield was 30% higher than in the first extraction step. Thus, it can be concluded that the two cell disruption methods did not

differ with respect to extraction efficiency. There was also no significant effect of extraction time, extraction temperature and pH observed. However, the extraction efficiency of mannoheptulose increased by about 30% when the extraction was repeated 3 times.

3.2 Extract purification

The first step consisted in the removal of glucose and fructose by treating the extract with *Saccharomyces cerevisiae*. The effect of the yeast concentration on the efficiency of the glucose and fructose removal was examined for yeast concentrations up to 18 gL⁻¹ (DW). Figure 3 shows that the degradation rate shows a linear increase with rising yeast concentrations up to 11.5 gL⁻¹. Higher yeast concentrations did not result in an equivalent increase of the degradation rate. Thus, the optimal dry weight yeast concentration is 11.5 gL⁻¹. After 10 min the glucose concentration at this yeast concentration and at 18 gL⁻¹ (DW) was less than 10% (the same is true for fructose after 68 min). The final concentration of glucose was 0.0099 gL⁻¹ and of fructose 0.0014 gL⁻¹. In Figure 4 the HPLC analysis of the avocado extract before and during the biotransformation is shown. Before the biotransformation, the signals for fructose, glucose, mannoheptulose and perseitol were easily recognizable. After 3 h, glucose and fructose were completely removed from the extract. In comparison, the peaks for mannoheptulose and perseitol remained nearly constant. This proves that *Saccharomyces cerevisiae* is not able to metabolize mannoheptulose or perseitol. In conclusion, the biotransformation with yeast is an effective method for glucose and fructose removal at the same not affecting the stability of mannoheptulose. The glucose and fructose free avocado extract contains mannoheptulose and perseitol as the main sugar compounds.

Separation and purification of the remaining sugars perseitol and mannoheptulose was done by preparative chromatography using a cation exchange resin in Ca²⁺-form. The elution of the

sugars was done with distilled water at different flow rates. The eluate was sampled in fractions and the sugar contents determined. The results are shown in figure 5. The mannoheptulose eluates before the perseitol with a minor overlay of both peaks. The area of the peak overlay decreases with lower flow rates and has its minimum at 2.45 mL min^{-1} . At this flow rate, solely 4.6% of the total eluted mannoheptulose would have to be discarded to obtain pure mannoheptulose.

Table 1 shows a comparison of the mannoheptulose elution under the two preconditions of maximal purity and maximal recovery at different flow rates. At a flow rate of 2.45 mL min^{-1} , after 79 min (respectively 193.6 mL eluent), 95.5% of the adsorbed mannoheptulose could be recovered with a purity of 100%. In comparison only 79.7% of the amount of pure mannoheptulose could be recovered at a flow rate of 5 mL min^{-1} and 65.2% at a flow rate of 7 mL min^{-1} .

3.3 Mass balance of mannoheptulose

The mass balance was carried out using the optimized parameters for the mannoheptulose release during extraction and extract purification. A single step extraction was carried out with 2,826 g flesh of Fuerte avocados, which were suspended 1:2 (w/w) in distilled water at room temperature for 45 min. After removal of the flesh and cells through centrifugation, the extract was used for biotransformation with 11.5 g L^{-1} yeast (DW) at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ and 100 rpm for 4 hours in order to remove glucose and fructose. After removal of the yeast cells by centrifugation, the proteins were precipitated and removed from the extract by centrifugation. The extract was concentrated under diminished pressure (150 mbar, $70 \text{ }^\circ\text{C}$). Mannoheptulose was separated from perseitol by preparative chromatography at a flow rate of 2.45 mL min^{-1} . The mannoheptulose fractions between 50 and 79 min (122.5 to 193.6 ml eluent) were

pooled. In each step of the whole isolation process, samples of the extract were taken for further analysis through HPLC.

Figure 6 shows the extracted mannoheptulose amounts and mannoheptulose yields at each step of the isolation process. From 2.83 kg avocados, 6.94 g mannoheptulose could be extracted, corresponding to a yield of 0.25% (w/w) mannoheptulose for the single step extraction. During the extract purification, the mannoheptulose yield of the biotransformation reached approx. 99%, the one of the preparative chromatography nearly 95%, thus avoiding a significant loss of mannoheptulose. The yield during the protein precipitation was approx. 86%, probably due to interactions of mannoheptulose with precipitated protein molecules. The yield of the total extraction process reached 73%. Thus, out of the initially extracted 6.9 g mannoheptulose, 5 g mannoheptulose remained in the final extract. No other sugars such as perseitol, glucose or fructose were found in the final extract, guaranteeing the purity of the final mannoheptulose extract. The final extract was freeze dried under vacuum. Although no contaminations could be identified, the product could not be obtained in a solid crystalline form but was slightly sludgy. Anion-chromatography analysis showed only chloride at a concentration of 0.023% (w/w) of in the final product. NMR-analysis showed pure mannoheptulose.

3.4 Proof of biological activity

When compared with the control sample without any inhibitor, the extracted mannoheptulose at a concentration of 25 mmol L⁻¹ decreased glucokinase enzyme activity by 55 - 57% (Table 2). In comparison, the mannoheptulose standard (purchased from Glucoteam, Hamburg) at the same concentration reduced enzyme activity by approximately 65%.

4 Discussion

The isolation procedure originally described by La Forge in 1917 could be modified and optimized through the combination of biotransformation and preparative chromatography as shown in the presented study. The developed effective and fast method yields a pure extract of mannoheptulose with a total yield of 73% in regard to the soluble mannoheptulose content in avocados. While maintaining the simple and cheap method of ethanol protein precipitation from La Forge, work intensive downstream steps were enhanced. In particular, the time consuming filtration cycles of the fatty avocado suspensions were replaced by centrifugation steps. Special cell disruption methods like ultrasonic treatment of the avocado cells or high temperature extraction as well as extraction time, extraction temperature and pH during the extraction had no impact on the mannoheptulose yield. However, the amount of mannoheptulose could be increased by about 30% through repetitive extractions.

Glucose and fructose could efficiently be removed from the sugar extract with yeast at a concentration of 11.5 gL⁻¹ (DW), whereby already after 10 min the glucose concentration fell below 10% (for fructose after 68 min). The preparative chromatography allowed an efficient separation of mannoheptulose and perseitol, whereby 95% of the bound mannoheptulose could be recovered with a purity of 100%. The combination of biotransformation and downstream processing has thus proven to be an efficient method to produce a pure extract of mannoheptulose. Considering the obtained extraction yield, the isolation of approx. 28 g mannoheptulose from 1 kg of avocados is possible. In addition, a high purified perseitol fraction is obtained as by-product (data not shown).

Finally, the freeze dried avocado extracts, even so having not reached a full crystalline state, were found to efficiently inhibit the enzyme glucokinase. The biological activity is in the same range as commercial available synthesized mannoheptulose. The synthesis of

mannoheptulose is up to now only realised in small quantities, resulting in a price of about 650 € g⁻¹. The described integrated bioprocess allows the fast production of high amounts of mannoheptulose from renewable resources using GRAS microorganisms and chemicals, which are allowed as food additives. Thus, the use of the produced mannoheptulose as food additive (functional food; e.g. preventing hypoglycemia) or as pharmaceutical should be easily possible. Furthermore, it seems reasonable to assume that the method of biotransformation of degradable sugars prior to the downstream processing can be transferred to other extraction processes.

References

- [1] Coore, H.G., Randle, P.J., Simon, E., Kraicer, P.F., et al., Block of insulin secretion from the pancreas by D-mannoheptulose. *Nature*. 1963, *197*, 1264-1266.
- [2] Coore, H.G., Randle, P.J., Inhibition of glucose phosphorylation by mannoheptulose. *Biochem J*. 1964, *91*, 56–59.
- [3] Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C., Randle, P.J., Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release. *Biochem J*. 1973, *132*, 223–231.
- [4] Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J., Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets. *Biochem. J*. 1970, *119*, 5–15.
- [5] Lenzen, S., Panten, U., Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochem Pharmacol*. 1988, *37*, 371-378.
- [6] Tiedge, M., Richter, T., Lenzen, S., Importance of cysteine residues for the stability and catalytic activity of human pancreatic beta cell glucokinase. *Arch. Biochem. Biophys*. 2000, *375*, 251-60.
- [7] Board, M., Colquhoun, A., Newsholme, E., High K_m Glucose-phosphorylating (Glucokinase) Activities in a Range of Tumor cell lines and Inhibition of Rates of Tumor Growth by the Specific Enzyme inhibitor Mannoheptulose. *Cancer Research*. 1995, *55*, 3278-3285.
- [8] La Forge, F.B., D-Mannoketoheptose, a new sugar from the avocado. *J. Biol. Chem*. 1917, *28*, 511-522.
- [9] Liu, X., Sievert, J., Arpaia, M.L., Madore, M., Postulated Physiological Roles of the Seven-carbon Sugars, Mannoheptulose, and Perseitol in Avocado. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*. 2002, *127*(1), 108-114.

- [10] Shaw, P. E., Wilson, C. W., Knight, R. J., High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of D-manno-Heptulose, Perseitol, Glucose and Fructose in Avocado Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 1980, 28, 379-382.
- [11] Lenzen, S, Tiedge, M, Panten, U., Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocr. (Kbh)*. 1987, 115, 21-29.
- [12] Liu, X., Robinson, Madore, M., Witney, et al, "Hass" Avocado Carbohydrate Fluctuations II. Fruit Growth and Ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1999, 124(6), 676-681.

Figure legends

Fig. 1: Effect of different extraction parameters and methods carried out on 100 g Ettinger avocados mixed 1:2 w/w with water (HPLC measurement). The overlaid grey bars correspond to the sugars concentrations in mol l⁻¹.

Fig. 2: Sugar amount released after each extraction step of 80 g Ettinger avocados suspended with 1:2 w/w water at room temperature

Fig. 3: Glucose (A) and fructose (B) concentration in the Ettinger avocado extract plotted against the time. Incubation with several yeast concentrations (DW) was done at 30 °C, 100 rpm. The lower two graphs show the degradation rates for glucose (C) and fructose (D) in relation to the yeast concentration.

Fig. 4: HPLC analysis of the avocado extract treated with 11.5 gL⁻¹ baker's yeast (DW) and incubated by 30 °C, 100 rpm [HPLC parameters: 1mL min⁻¹, 80:20 v/v ACN/H₂O]

Fig. 5: Sugar concentration while the preparative chromatography carried out by 70 °C for 5.25 mL extract containing 14.5 gL⁻¹ mannoheptulose and dist. water as eluent with a flow rate of (A) 7 mL min⁻¹, (B) 5 mLmin⁻¹ and (C) 2.45 mLmin⁻¹ (HPLC measurement)

Fig. 6: Mannoheptulose (MH) amounts extracted and yields step by step (HPLC analysis, mass balance with 2826.9 g avocados Fuerte)

Tab. 1:Purity and mannoheptulose recovery under different elution and flow rate conditions

Flow rate	Eluted volume	Purity	Recovery
[mL min⁻¹]	[mL]	[%]	[%]
7	189	100	65.17
7	245	83.95	100
5	175	100	79.7
5	215	86.63	100
2.45	193.6	100	95.46
2.45	218.1	91.28	100

Tab. 2: Results of the enzymatic inhibition test for glucokinase

Sample	Concentration	Inhibition
	[mmol L⁻¹]	[%]
reference, without inhibitor	0	0
MH-standard	25	64.7
MH-extract, after purification, liquid	21.74	56.83
freeze dried substance, crystalline	25	56.3

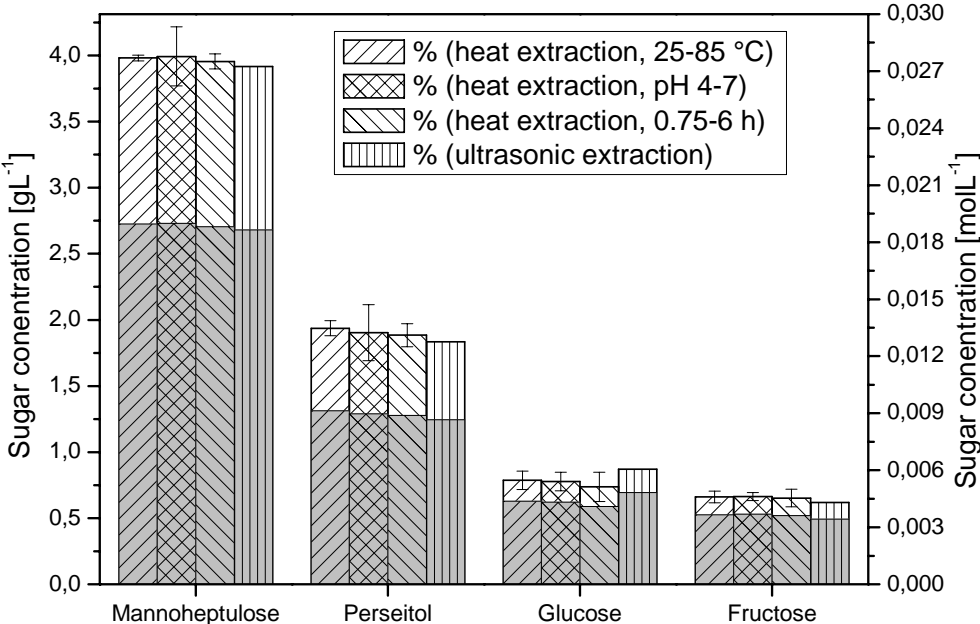


Fig. 1

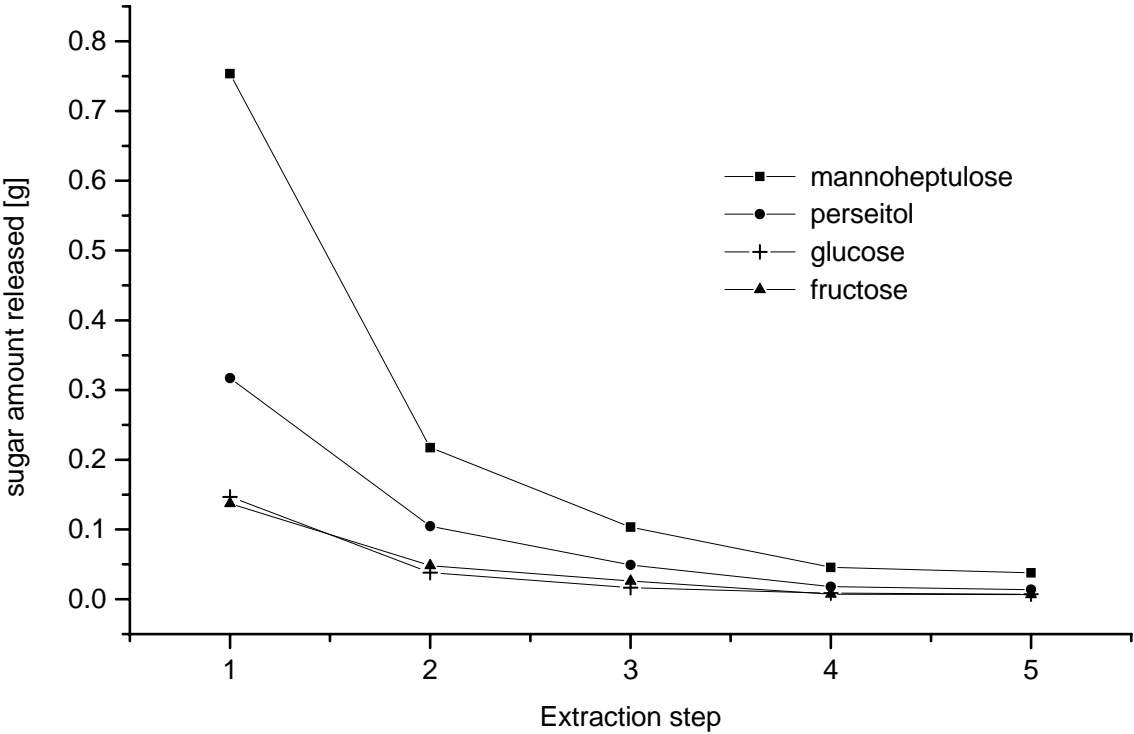


Fig. 2

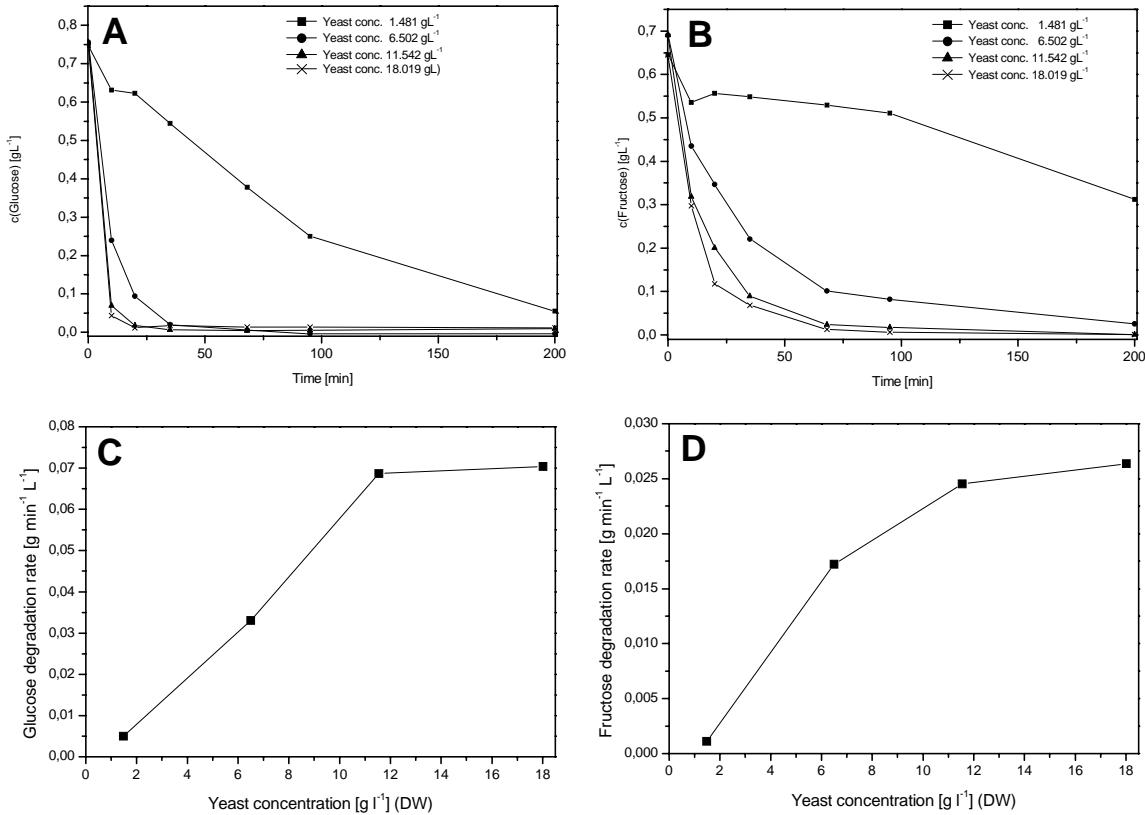


Fig. 3

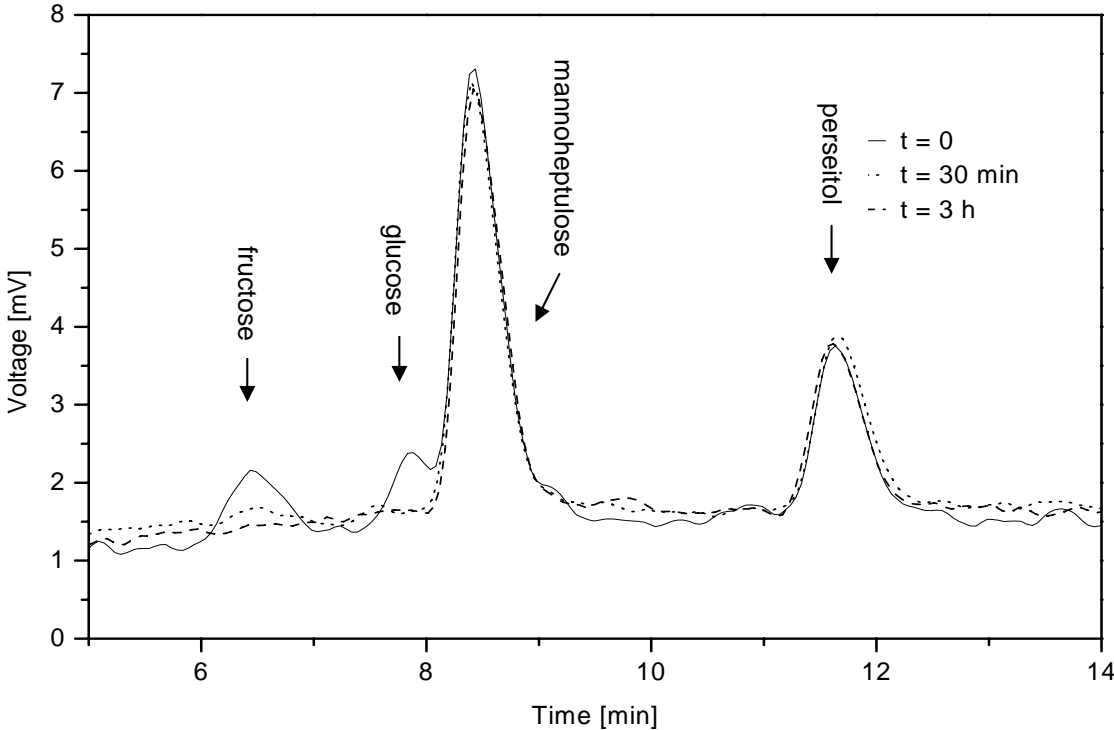


Fig.4

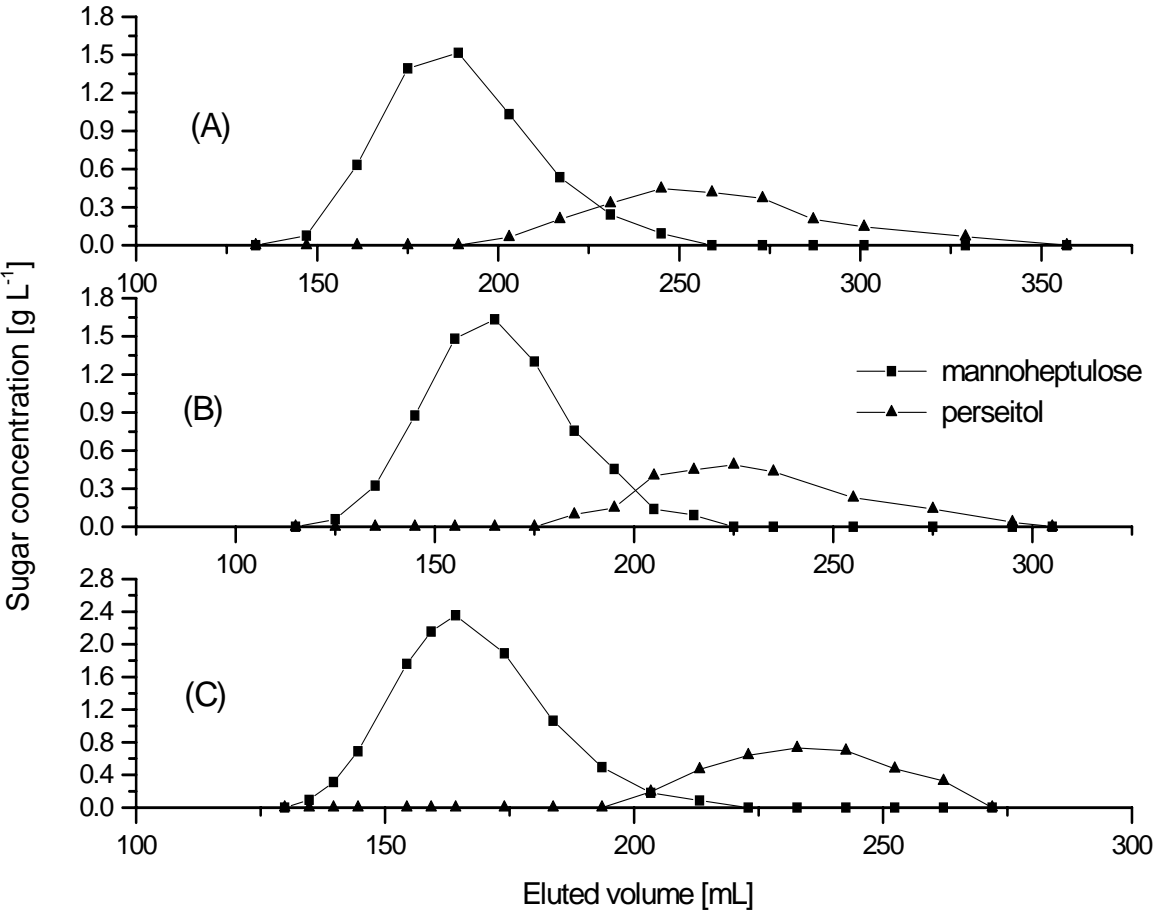
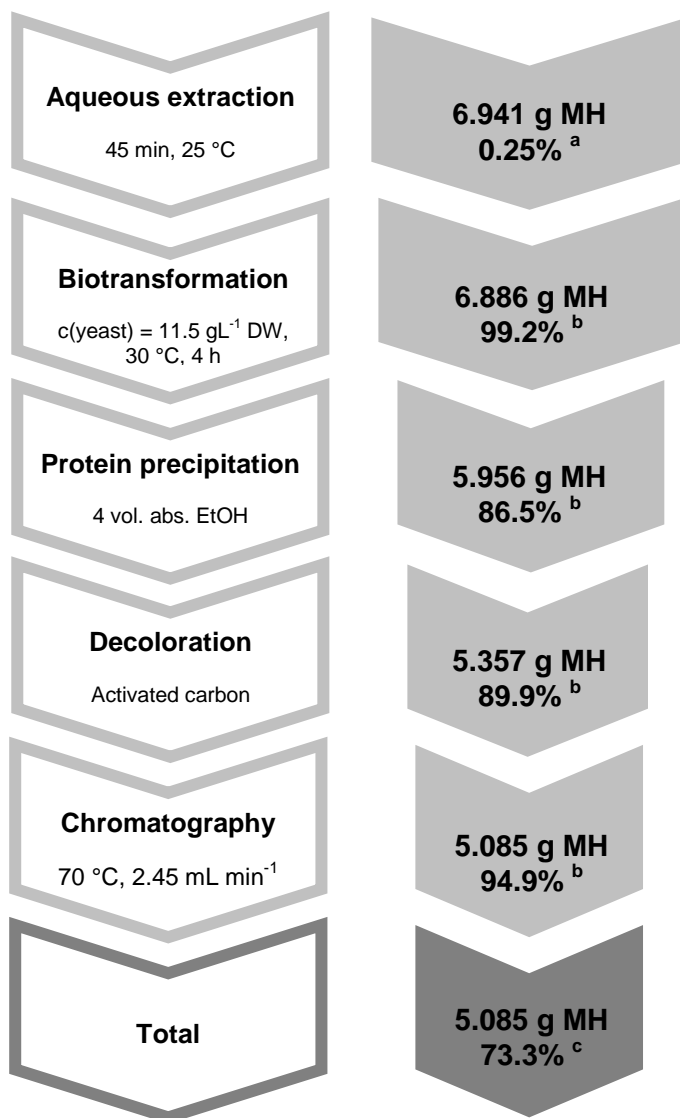


Fig. 5



^arelated to m_{avocado}

^brelated to previous step

^crelated to extracted mannoheptulose

Fig. 6

Activation of glucokinase by the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and the chemical compound LY2121260

Running title: Glucokinase activation

Simone Baltrusch^{1,2}, Heike Schmitt¹, Sara Langer¹ and Sigurd Lenzen¹

¹Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, 30623 Hannover, Germany

²Institute of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Rostock, 18057 Rostock, Germany

December 2009

Corresponding author:

Prof. Dr. Simone Baltrusch
Institute of Medical Biochemistry and Molecular Biology
University of Rostock
18057 Rostock
Germany
Tel. 0049-381-494-5760
Fax 0049-381-494-5752
E-mail: simone.baltrusch@med.uni-rostock.de

GK, glucokinase; PFK-2/FBPase-2, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase;

OBJECTIVE Metabolic stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells is dependent on the glucose phosphorylating enzyme glucokinase. Activation of glucokinase is endogenously mediated by interaction with the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and can be achieved also by a new class of compounds that might be useful for type 2 diabetes therapy. In this study, we examined whether the regulation of glucokinase enzyme conformation and activation by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in beta-cells influences the response to a chemical glucokinase activator.

RESEARCH DESIGN AND METHODS Enzyme activities of recombinant glucokinase protein and protein extracts isolated from insulin-producing RINm5F cells were studied in dependence upon 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, the glucokinase activator LY2121260, the sugar mannoheptulose and the sugar alcohol perseitol.

RESULTS While activation of glucokinase by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase resulted exclusively in a significant increase of the enzymatic phosphorylating capacity, LY2121260 increased in addition the affinity of glucokinase to glucose. In cellular extracts from glucokinase plus 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase overexpressing RINm5F cells and by use of recombinant proteins an additive glucokinase activating effect of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and LY2121260 was observed, highest at glucose concentrations below 12.5 mmol/l. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase partly antagonized competitive glucokinase inhibition by mannoheptulose. But while LY2121260 did not counteract inhibition by mannoheptulose, perseitol could be identified as a new glucokinase inhibitor, whose action was significantly antagonized by LY2121260.

CONCLUSIONS We demonstrated that LY2121260 binds to glucokinase in the presence of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Furthermore this study provided evidence that 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase facilitates the glucose effect on the intracellular glucokinase conformational equilibrium, while LY2121260 enforces the closed conformation independently of glucose, thus, being unable to counteract competitive inhibition.

INTRODUCTION

The glucose phosphorylating enzyme glucokinase has a flux controlling role in glycolysis (1; 2). In contrast to the other members of the hexokinase family glucokinase shows a sigmoidal saturation curve and a low affinity for its substrate glucose (2-6). Thus, glucokinase is well suited to play the crucial role of the glucose sensor in the pancreatic beta cell thereby controlling glucose-induced insulin secretion (1; 2; 4; 6; 7). Recent studies indicate that the enzyme acts in a tissue-specific manner also in endocrine cells of the gut, pituitary gland, and brain (1). In liver, with a high expression level, glucokinase is the main regulator of glucose metabolism (8).

Glucose binding induces a global conformational transition of glucokinase (9). This is the explanation for the positive cooperativity of glucokinase although the enzyme is clearly monomeric (10). Kinetic models, namely the mnemonical and the slow-transition model have been suggested long time ago to illustrate the glucokinase positive cooperativity (11-13). In 2004, two glucokinase conformations were characterized by its crystal structure, a super-opened, catalytically inactive glucokinase conformation and a closed, catalytically active one (14). But there is convincing evidence that further conformational states exist during the transition between the closed and super-opened conformation (14; 15). Three intermediates on that pathway have been recently assumed from fluorescence spectroscopy measurements indicating intracellular equilibration of glucokinase conformations in dependence upon the glucose concentration (16).

This glucose-mediated regulation of glucokinase is modulated on the posttranslational level by interaction with different proteins (1; 17). In liver, glucokinase is inhibited by its glucokinase regulatory protein, which binds in a fructose-6-phosphate dependent manner and shuttles glucokinase to the nucleus (18-21). The bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) was established as an activating

glucokinase binding partner, both in liver and in pancreatic beta cells (2; 17; 22-26). It was shown, that interaction between glucokinase and the bifunctional enzyme is mediated by a motive, which is present in all isoforms in the bisphosphatase domain (23). The corresponding binding site within the glucokinase protein is yet not identified. Activation of glucokinase through PFK-2/FBPase-2 increases the V_{\max} value of the enzyme, while the $S_{0.5}$ for glucose remained unchanged (17; 24). In beta cells glucokinase activation by PFK-2/FBPase-2 potentiates glucose-induced insulin secretion (17).

An increase of insulin secretion to an extent that induces hypoglycaemia was identified in patients carrying activating glucokinase mutations (27). The activating mutations, which are located in the hinge domain opposite and spatially remote from the glucose binding site significantly reduce the $S_{0.5}$ of glucokinase for glucose (27-32). The region, which accommodates the activating mutations (29; 31) is the allosteric binding site of small molecules, which were recently discovered to act as glucokinase activators (14; 33-38). Their use as antihyperglycemic agents is an attractive therapeutic concept (39-42). Currently glucokinase activators are a fast growing heterogeneous class of chemical compounds differing both in structure and function (35; 36; 42). The action of the available compounds obviously varies in their activating potency and by the way how they modify maximal enzyme velocity (V_{\max}) and affinity to glucose ($S_{0.5}$) (14; 33-37). The recently discovered glucokinase activator LY2121260 raises both the V_{\max} and the $S_{0.5}$ value (35). It has been demonstrated that LY2121260 increases insulin secretion in isolated rat pancreatic islets and stimulates glucose uptake in cultured rat hepatocytes. Furthermore, an improved glucose tolerance after an oral glucose challenge was demonstrated in healthy rats (35).

To date the interplay between the endogenous activator PFK-2/FBPase-2 and small molecule activators like LY2121260 on glucokinase enzyme activity is unknown. The aim of this study

was to analyse in a comprehensive manner the molecular mechanisms of glucokinase activation by PFK-2/FBPase-2 and LY2121260.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Materials. Mannoheptulose and perseitol were from Glycoteam (Hamburg, Germany) and sedoheptulose from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The glucokinase activator LY2121260 (2-(S)-cyclohexyl-1-(R)-(4-methanesulfonyl-phenyl)-cyclopropanecarboxylic acid thiazol-2-ylamide) (35) used in this study was kindly provided by Eli Lilly (Lilly Research Laboratories, Hamburg, Germany). All tissue culture equipment was from Invitrogen (Karlsruhe, Germany) and Greiner-Bio One (Frickenhausen, Germany).

RINm5F cell culture. Insulin-producing RINm5F cells overexpressing glucokinase (RINm5F-GK cells) were generated by stable transfection of the human beta cell glucokinase cDNA as described previously (43). RINm5F-GK cells overexpressing PFK-2/FBPase-2 were generated by a second stable transfection of the cDNA for rat islets (RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 I 4) as described (24). Cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10 mmol/l glucose, 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), penicillin and streptomycin in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. The medium for RINm5F-GK cells was additionally supplemented with 250 µg/ml G418 and the medium for RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells with 250 µg/ml G418 and 250 µg/ml ZeocinTM. For glucokinase activity measurements cells were homogenized in phosphate buffered saline (pH 7.4) and insoluble material was pelleted by centrifugation. The protein concentration was quantified by a Bio-Rad protein assay.

Recombinant glucokinase and FBPase-2 protein. Recombinant beta cell glucokinase was expressed and purified as His₆-tag protein by the pQE30 vector system as described previously (44). The bisphosphatase domain of rat liver PFK-2/FBPase-2 (amino acid residues 250–470) was expressed and purified as GST-tag protein by the pGEX-6P-1 vector system. The cleavage of the GST-tag was achieved with PreScission protease as described (21).

Glucokinase enzyme activity. Glucose phosphorylating activity was measured at different glucose concentrations (1, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 and 100 mmol/l) in recombinant protein solutions or soluble cellular fractions of RINm5F-GK and RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 (I 4) cells by an enzyme-coupled photometric assay as described previously (45). Pretreatment was performed as indicated. One unit of enzyme activity was defined as 1 μ mol glucose-6-phosphate formed from glucose and ATP per minute at 37°C. Enzyme activities were expressed as units per mg glucokinase protein or cellular protein, respectively. V_{\max} values were estimated by sigmoidal curve fitting. $S_{0.5}$ and Hill coefficients of glucokinase were calculated from Hill plots.

Native protein separation and Dot Blotting. Cells were homogenized in phosphate buffered saline (pH 7.4) and insoluble material was pelleted by centrifugation. The supernatant was incubated for 1 h with 25 mmol/l glucose alone or in addition with 10 μ M LY2121260. Thereafter for gel filtration chromatography the lysate was loaded on a HiLoad 16/60 Superdex 200 column and eluted with 1 ml/min using ÄKTA® PrimePlus system (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Resolution of protein separation in the molecular range was calibrated using recombinant glucokinase, bovine serum albumin (70 kDa), aldolase (158 kDa) and catalase (232 kDa). 15 μ l of each fraction was electroblotted to equilibrated polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes using a 96-well Dot-Blot system (Roth, Karlsruhe, Germany). Nonspecific binding sites of the membranes were blocked by non-fat dry milk overnight at 4°C. Glucokinase and PFK-2/FBPase-2 immunodetection was performed as described (24).

Statistical analyses. Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed by ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparisons using the Prism analysis program (Graphpad Inc., San Diego, CA).

RESULTS

Glucokinase inhibition by mannoheptulose and perseitol. Mannoheptulose and sedoheptulose are epimers. The C7 sugars differ only in the location of the hydroxyl group at the 4th carbon atom (Fig. 1). Glucokinase was significantly inhibited by mannoheptulose in a concentration-dependent manner (Fig. 2). This inhibition was sugar conformation selective as sedoheptulose did not affect glucokinase enzyme activity (Fig. 2). However, the C7 sugar alcohol perseitol with a mannoheptulose corresponding structure at the 4th carbon atom (Fig. 1) showed a significant inhibition of glucokinase (Fig. 2). Mannoheptulose and perseitol increased the $S_{0.5}$ value of glucokinase for glucose (control, 7.26 ± 0.46 mmol/l) to 17.9 ± 1.57 mmol/l and 15.1 ± 2.53 mmol/l, respectively indicating competitive inhibition (Table 1).

Activation of glucokinase enzyme activity by LY2121260 in dependence upon inhibition through mannoheptulose and perseitol. Treatment of glucokinase with LY2121260 resulted both in an increase in the maximal enzyme velocity (V_{\max} 2.85 ± 0.11 U/mg versus 4.18 ± 0.06 U/mg) and an increase in the affinity to its substrate glucose ($S_{0.5}$ 7.26 ± 0.46 mmol/l versus 2.51 ± 0.06 mmol/l) (Table 1, Fig. 3). Glucokinase activation by LY2121260 was accompanied by a slight decrease in the enzyme cooperativity (n_{Hill} 1.79 ± 0.09 vs 1.59 ± 0.12). Sedoheptulose did not counteract glucokinase activation by LY2121260 (Fig. 3), while mannoheptulose and perseitol showed different actions. Interestingly the chemical compound LY2121260 was not able to activate glucokinase in the presence of mannoheptulose. In contrast the affinity of glucokinase to glucose significantly decreased further ($S_{0.5}$ 17.9 ± 1.57 mmol/l versus 29.9 ± 2.92 mmol/l) (Table 1, Fig. 3). LY2121260 increased at least in part glucokinase enzyme activity in the presence of perseitol and evoked a significant increase in both the maximal enzyme velocity (V_{\max} 1.48 ± 0.13 U/mg versus 2.53 ± 0.10 U/mg) and the affinity to its substrate glucose ($S_{0.5}$ 15.1 ± 2.53 mmol/l versus 3.55 ± 0.43 mmol/l) (Table 1, Fig. 3).

Comparison of glucokinase activation by the chemical compound LY2121260 and the protein FB Pase-2. Glucokinase interaction with the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FB Pase-2) is mediated by the bisphosphatase domain (FB Pase-2) (23). Incubation of glucokinase with FB Pase-2 in a 1:5 molar ratio significantly increased the maximal enzyme velocity (V_{\max} 2.85 ± 0.11 U/mg versus 4.98 ± 0.72 U/mg), but did not change the affinity to glucose ($S_{0.5}$ 7.26 ± 0.46 mmol/l versus 7.09 ± 0.27 mmol/l) (Table 2, Fig. 4). Thus, FB Pase-2 provoked glucokinase activation by a mechanism different from that of the chemical compound LY2121260, although both LY2121260 and FB Pase-2 were able to increase the glucokinase V_{\max} value by 47 % and 75 %, respectively (Table 2). Activation of glucokinase by LY2121260 in the presence of FB Pase-2 resulted in a further increase of the glucokinase enzyme velocity by 30 % (Table 2, Fig. 4). However, a significant decrease in the $S_{0.5}$ value of glucokinase for glucose was caused also by activation through LY2121260 plus FB Pase-2 in comparison to FB Pase-2 alone ($S_{0.5}$ 1.92 ± 0.16 mmol/l versus 7.09 ± 0.27 mmol/l) (Table 2).

Characterization of glucokinase interaction, activation and inhibition in RINm5F cells.

The stable insulin-producing cell lines RINm5F-GK and RINm5F-GK-PFK-2/FB Pase-2 express the glucokinase protein on the same level, but show a significant difference in their glucokinase enzyme activity as previously demonstrated (17; 24). Overexpression of PFK-2/FB Pase-2 resulted in an increase in glucokinase enzyme activity at 100 mmol/l glucose by 40 % (Fig. 5). Treatment of RINm5F-GK cells with LY2121260 increased the glucokinase enzyme activity at 100 mmol/l glucose by 27 % and increased the glucokinase enzyme activity in RINm5F-GK-PFK-2/FB Pase-2 cells by 17 % (Fig. 5 and 6). Indeed glucokinase activation through interaction with the endogenous activator PFK-2/FB Pase-2 was highest at glucose concentrations greater than 6.25 mmol/l. In agreement with our results observed using recombinant proteins, an additional increase in the glucokinase enzyme activity was achieved by LY2121260 treatment (Fig. 5 and 6). However, both glucokinase activation through

LY2121260 in RINm5F-GK cells and PFK-2/FBPase-2 overexpressing RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells was highest below 6.25 mmol/l glucose (Fig. 6). Glucokinase-PFK-2/FBPase-2 complex formation in RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 was detectable as a higher molecular weight fraction by gel filtration chromatography in comparison to RINm5F-GK cells (Fig. 7). Glucokinase was verifiable by Dot-Blot immunodetection analysis in fractions between 50 – 70 kDa and additionally within a molecular range between 130 – 230 kDa. The first peak (50 – 70 kDa) corresponded to the elution of separated recombinant glucokinase protein in control experiments (data not shown). In fractions within the peak at higher molecular weight (130 – 230 kDa) PFK-2/FBPase-2 was identified by Dot-Blot immunodetection analysis with a specific antibody raised against the FBPase-2 domain (data not shown) (24). Indeed, the glucokinase-PFK-2/FBPase-2 complex was not abolished by treatment with LY2121260 (Fig. 7). Mannoheptulose inhibited glucokinase enzyme activity in both RINm5F-GK and RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells (Fig. 5). However, in RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells glucokinase enzyme activity at 100 mmol/l glucose was not reduced to the control value observed in RINm5F-GK (Fig. 5). Thus, at least in part PFK-2/FBPase-2 was able to counteract glucokinase inhibition by mannoheptulose especially at glucose concentrations greater than 12.5 mmol/l (Fig. 6). In contrast, LY2121260 was not able to activate glucokinase in the presence of mannoheptulose (Fig. 5 and 6).

DISCUSSION

Glucokinase is the glucose sensor in pancreatic beta cells and the key regulator of glucose metabolism in liver (1; 2; 4; 6; 7; 46). Therapeutically activation of glucokinase is a promising idea to reduce hyperglycemia in type 2 diabetic individuals, thus several chemical glucokinase activators have been recently developed (14; 33-38). While the blood glucose lowering effect of many of these compounds have been demonstrated in studies with healthy and diabetic animals, to date only few have been applied in humans (39-42). Orally administered activators have been shown to increase insulin secretion from the pancreatic beta-cells and glucose usage in liver (33-35).

The glucokinase activators bind to an allosteric site of glucokinase thereby increasing enzyme activity. However, little is known how the activators interfere with the important posttranslational glucokinase regulation in both beta cells and liver. The glucokinase inhibition through the glucokinase regulatory protein that takes place in liver has been shown to be counteracted by most of the glucokinase activators (47; 48). In this study glucokinase activation by the endogenous interaction partner PFK-2/FBPase-2 and the chemical compound LY2121260 has been elucidated. In agreement with previous studies (35) LY2121260 has increased the affinity of glucokinase to glucose. In contrast, the low affinity for glucose was maintained by endogenous activation through the bifunctional enzyme PFK-2/FBPase-2. Both activators were able to increase the maximal velocity of the enzyme; PFK-2/FBPase-2 to a greater extent than LY2121260. This feature of LY2121260 cannot be generally attributed to the class of glucokinase activators. Other activators have been demonstrated to solely increase the $S_{0.5}$ (36-38). It remains open, by which mechanism LY2121260 is able to increase the V_{max} , since activating mutations which are located in this allosteric binding region of the glucokinase activator did not significantly affect the V_{max} (27-32).

Activation of glucokinase enzyme activity by PFK-2/FBPase-2 in cellular extracts from insulin-secreting RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells has been elucidated before (24). Furthermore this activation has been shown with purified recombinant proteins after one hour pre-incubation (26). The protein-protein interaction between glucokinase and the single FBPase-2 domain of the bifunctional enzyme, which contains the glucokinase binding site, has been already established (23; 26). The present study demonstrates that the recombinantly expressed FBPase-2 domain alone was able to activate glucokinase. Altogether this indicates that the glucokinase:FBPase-2 complex alone causes glucokinase activation. However, glucokinase activation was higher in cellular extracts compared to recombinant proteins and a 1:5 molecular ratio of glucokinase:FBPase-2 was necessary to evoke activation using recombinant proteins. Thus, it is likely that first, the PFK-2 domain has a regulatory role and second, intracellularly available components promote complex formation and stabilize the interaction. Previous studies have provided considerable evidence for glucose promoted complex formation (17; 26).

In this study it was demonstrated for the first time, that the glucokinase:PFK-2/FBPase-2 complex was not diminished by the glucokinase activator LY2121260. Interestingly it has been shown that LY2121260 is able to further activate glucokinase in the presence of PFK-2/FBPase-2. The combined beneficial effect of both activators on the maximal velocity is of particular interest and might be unique for the glucokinase activator LY2121260. An increase in the V_{\max} will result in higher glucokinase activity only at stimulatory glucose concentrations, thus keeping glucose-induced insulin secretion vital. The $S_{0.5}$ value was significantly decreased through LY2121260 also in the presence of PFK-2/FBPase-2, which will result in an active enzyme already at sub-stimulatory glucose concentrations, therefore increasing the likelihood of hypoglycemia.

Several studies support in addition to the two crystallographically confirmed conformations, namely the closed active and super-opened inactive conformation, the existence of additional intermediate conformations of glucokinase (14-16). For a comprehensive explanation of the positive cooperativity of the enzyme five glucokinase conformations in a glucose dependent intracellular equilibrium have been proposed in a recent study (16). With respect to such a “multiple conformational state model” it can be presumed, that LY2121260 freezes the closed glucokinase conformation and thus prevents the glucose dependent equilibration of glucokinase conformations resulting in a decrease of $S_{0.5}$. Rather, the endogenous activation by PFK-2/FBPase-2 appears to be highly flexible and thus works together with glucose towards equilibration of glucokinase conformations and maintains the $S_{0.5}$.

To proof this hypothesis and to further elucidate the molecular mechanisms of glucokinase activation the competitive inhibitor mannoheptulose has been applied in this study (44; 49). Mannoheptulose stabilizes the closed glucokinase conformation (50; 51). So far it was demonstrated by two different studies that glucokinase could not be activated by a chemical activator in the presence of mannoheptulose (36; 38). This seems to be a unique feature of the glucokinase activators, since in this study it has been shown that mannoheptulose also completely counteracted glucokinase activation through LY2121260. In contrast, PFK-2/FBPase-2 has achieved activation in the presence of mannoheptulose, but only at higher glucose concentrations. This can be convincingly explained by the fact, that glucose displaced the competitive inhibitor mannoheptulose from the catalytic site at higher concentrations. For this process the conformation of glucokinase has to be changed, as it is possible in the presence of PFK-2/FBPase-2, but not in the presence of LY2121260.

The heptose mannoheptulose has been shown to have a high affinity to the catalytic center of glucokinase. To proof the hypothesis, that the position of the hydroxyl group at the 4th carbon atom in the heptose is mandatory for binding to glucokinase, the effect of the epimer of

mannoheptulose, namely sedoheptulose was determined. Indeed sedoheptulose did not inhibit glucokinase. Furthermore the action of perseitol on glucokinase, the sugar alcohol of mannoheptulose (52), holding the same orientation of the hydroxyl group at the 4th carbon atom was analyzed. Interestingly perseitol has been elucidated in this study as a new inhibitor of glucokinase. It could be clearly demonstrated that perseitol is a competitive inhibitor in the same way as mannoheptulose. Furthermore it was shown that LY2121260 was at least in part able to counteract inhibition by perseitol. Thus, the sugar alcohol seems to have a lower affinity to the catalytic center of glucokinase compared to mannoheptulose.

Notably, the analysis of intracellular inhibition of glucokinase by perseitol was not feasible, as neither insulin-secreting RINm5F and MIN6 cells nor COS cells took up the sugar alcohol. Thus, it can be assumed that neither the GLUT 1 glucose transporter, mainly expressed in COS cells (53), nor the GLUT 2 glucose transporter mainly expressed in beta-cells (54) can channel perseitol in contrast to mannoheptulose. It has been proposed that intestinal uptake of sugar alcohols is mediated by the fructose transporter GLUT 5 (53). However, so far experimental studies are only available in sparrows and furthermore the GLUT 5 transporter is not expressed in pancreatic beta-cells (55).

In conclusion, this study provides evidence that PFK-2/FBPase-2 through complex formation with glucokinase facilitates the glucose effect on the conformational equilibrium, while LY2121260 enforces the closed glucokinase conformation in which the enzyme is active independently of glucose.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the European Union (Integrated Project EuroDia LSHM-CT-2006-518153 in the Framework Programme 6 [FP6] of the European-Community). The authors are grateful to Veikko Koivisto, Alexander M. Efanov and David G. Barrett (Lilly Research Laboratories, Hamburg, Germany) for providing the glucokinase activator LY2121260. The skillful technical assistance of B. Leß is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Matschinsky FM, Magnuson MA, Zelent D, Jetton TL, Doliba N, Han Y, Taub R, Grimsby J: The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* 55:1-12, 2006
2. Baltrusch S, Tiedge M: Glucokinase Regulatory Network in Pancreatic β -Cells and Liver. *Diabetes* 55 Suppl 2:S55-64, 2006
3. Iynedjian PB: Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J* 293 (Pt 1):1-13, 1993
4. Lenzen S: Glucokinase: signal recognition enzyme for glucose-induced insulin secretion. In *Nutrient regulation of insulin secretion* Flatt PR, Ed. London and Chapel Hill, Portland Press, 1992, p. 101-125
5. Lenzen S, Freytag S, Panten U, Flatt PR, Bailey CJ: Alloxan and ninhydrin inhibition of hexokinase from pancreatic islets and tumoural insulin-secreting cells. *Pharmacol Toxicol* 66:157-162, 1990
6. Matschinsky FM: Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39:647-652, 1990
7. Matschinsky FM: Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45:223-241, 1996
8. Agius L: Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* 414:1-18, 2008
9. St Charles R, Harrison RW, Bell GI, Pilkis SJ, Weber IT: Molecular model of human beta-cell glucokinase built by analogy to the crystal structure of yeast hexokinase B. *Diabetes* 43:784-791, 1994
10. Koranyi LI, Tanizawa Y, Welling CM, Rabin DU, Permutt MA: Human islet glucokinase gene. Isolation and sequence analysis of full-length cDNA. *Diabetes* 41:807-811, 1992
11. Lin SX, Neet KE: Demonstration of a slow conformational change in liver glucokinase by fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem* 265:9670-9675, 1990
12. Cardenas ML: Kinetic behaviour of vertebrate hexokinases with emphasis on hexokinase D (IV). *Biochem Soc Trans* 25:131-135, 1997
13. Cornish-Bowden A, Storer AC: Mechanistic origin of the sigmoidal rate behaviour of rat liver hexokinase D ('glucokinase'). *Biochem J* 240:293-296, 1986

14. Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki J, Nagata Y: Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* 12:429-438, 2004
15. Zhang J, Li C, Chen K, Zhu W, Shen X, Jiang H: Conformational transition pathway in the allosteric process of human glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13368-13373, 2006
16. Antoine M, Boutin JA, Ferry G: Binding kinetics of glucose and allosteric activators to human glucokinase reveal multiple conformational states. *Biochemistry* 48:5466-5482, 2009
17. Baltrusch S, Langer S, Massa L, Tiedge M, Lenzen S: Improved metabolic stimulus for glucose-induced insulin secretion through GK and PFK-2/FBPase-2 coexpression in insulin-producing RINm5F cells. *Endocrinology* 147:5768-5776, 2006
18. van Schaftingen E, Vandercammen A, Detheux M, Davies DR: The regulatory protein of liver glucokinase. *Adv Enzyme Regul* 32:133-148, 1992
19. van Schaftingen E, Veiga-da-Cunha M, Niculescu L: The regulatory protein of glucokinase. *Biochem Soc Trans* 25:136-140, 1997
20. Vandercammen A, Van Schaftingen E: Competitive inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein. *Eur J Biochem* 200:545-551, 1991
21. Baltrusch S, Francini F, Lenzen S, Tiedge M: Interaction of glucokinase with the liver regulatory protein is conferred by leucine-asparagine motifs of the enzyme. *Diabetes* 54:2829-2837, 2005
22. Arden C, Hampson LJ, Huang GC, Shaw JA, Aldibbiat A, Holliman G, Manas D, Khan S, Lange AJ, Agius L: A role for PFK-2/FBPase-2, as distinct from fructose 2,6-bisphosphate, in regulation of insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Biochem J* 411:41-51, 2008
23. Baltrusch S, Lenzen S, Okar DA, Lange AJ, Tiedge M: Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner. *J Biol Chem* 276:43915-43923, 2001
24. Massa L, Baltrusch S, Okar DA, Lange AJ, Lenzen S, Tiedge M: Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes* 53:1020-1029, 2004

25. Payne VA, Arden C, Wu C, Lange AJ, Agius L: Dual role of phosphofruktokinase-2/fructose biphosphatase-2 in regulating the compartmentation and expression of glucokinase in hepatocytes. *Diabetes* 54:1949-1957, 2005
26. Smith WE, Langer S, Wu C, Baltrusch S, Okar DA: Molecular coordination of hepatic glucose metabolism by the 6-phosphofruktokinase/fructose-2,6-bisphosphatase:glucokinase complex. *Mol Endocrinol* 21:1478-1487, 2007
27. Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matschinsky FM, Herold KC: Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med* 338:226-230, 1998
28. Christesen HB, Brusgaard K, Beck Nielsen H, Brock Jacobsen B: Non-insulinoma persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia caused by an activating glucokinase mutation: hypoglycaemia unawareness and attacks. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68:747-755, 2008
29. Christesen HB, Jacobsen BB, Odili S, Buettger C, Cuesta-Munoz A, Hansen T, Brusgaard K, Massa O, Magnuson MA, Shiota C, Matschinsky FM, Barbetti F: The second activating glucokinase mutation (A456V): implications for glucose homeostasis and diabetes therapy. *Diabetes* 51:1240-1246, 2002
30. Cuesta-Munoz AL, Huopio H, Otonkoski T, Gomez-Zumaquero JM, Nanto-Salonen K, Rahier J, Lopez-Enriquez S, Garcia-Gimeno MA, Sanz P, Soriguer FC, Laakso M: Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycemia due to a de novo glucokinase mutation. *Diabetes* 53:2164-2168, 2004
31. Gloyn AL, Noordam K, Willemsen MA, Ellard S, Lam WW, Campbell IW, Midgley P, Shiota C, Buettger C, Magnuson MA, Matschinsky FM, Hattersley AT: Insights into the biochemical and genetic basis of glucokinase activation from naturally occurring hypoglycemia mutations. *Diabetes* 52:2433-2440, 2003
32. Wabitsch M, Lahr G, Van de Bunt M, Marchant C, Lindner M, von Puttkamer J, Fenneberg A, Debatin KM, Klein R, Ellard S, Clark A, Gloyn AL: Heterogeneity in disease severity in a family with a novel G68V GCK activating mutation causing persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy. *Diabet Med* 24:1393-1399, 2007
33. Grimsby J, Matschinsky FM, Grippo JF: Discovery and action of glucokinase activators. In *Glucokinase and glycemic disease* Matschinsky FM, Magnuson MA, Eds. Basel, Karger, 2004, p. 360-378

34. Grimsby J, Sarabu R, Corbett WL, Haynes NE, Bizzarro FT, Coffey JW, Guertin KR, Hilliard DW, Kester RF, Mahaney PE, Marcus L, Qi L, Spence CL, Teng J, Magnuson MA, Chu CA, Dvorozniak MT, Matschinsky FM, Grippo JF: Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. *Science* 301:370-373, 2003
35. Efanov AM, Barrett DG, Brenner MB, Briggs SL, Delaunois A, Durbin JD, Giese U, Guo H, Radloff M, Gil GS, Sewing S, Wang Y, Weichert A, Zaliani A, Gromada J: A novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function. *Endocrinology* 146:3696-3701, 2005
36. Brocklehurst KJ, Payne VA, Davies RA, Carroll D, Vertigan HL, Wightman HJ, Aiston S, Waddell ID, Leighton B, Coghlan MP, Agius L: Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators. *Diabetes* 53:535-541, 2004
37. Fyfe MC, White JR, Taylor A, Chatfield R, Wargent E, Printz RL, Sulpice T, McCormack JG, Procter MJ, Reynet C, Widdowson PS, Wong-Kai-In P: Glucokinase activator PSN-GK1 displays enhanced antihyperglycaemic and insulinotropic actions. *Diabetologia* 50:1277-1287, 2007
38. Johnson D, Shepherd RM, Gill D, Gorman T, Smith DM, Dunne MJ: Glucose-dependent modulation of insulin secretion and intracellular calcium ions by GKA50, a glucokinase activator. *Diabetes* 56:1694-1702, 2007
39. Guertin KR, Grimsby J: Small molecule glucokinase activators as glucose lowering agents: a new paradigm for diabetes therapy. *Curr Med Chem* 13:1839-1843, 2006
40. Leighton B, Atkinson A, Coghlan MP: Small molecule glucokinase activators as novel anti-diabetic agents. *Biochem Soc Trans* 33:371-374, 2005
41. Printz RL, Granner DK: Tweaking the glucose sensor: adjusting glucokinase activity with activator compounds. *Endocrinology* 146:3693-3695, 2005
42. Matschinsky FM: Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8:399-416, 2009
43. Tiedge M, Elsner M, McClenaghan NH, Hedrich HJ, Grube D, Klempnauer J, Lenzen S: Engineering of a glucose-responsive surrogate cell for insulin replacement therapy of experimental insulin-dependent diabetes. *Hum Gene Ther* 11:403-414, 2000

44. Tiedge M, Krug U, Lenzen S: Modulation of human glucokinase intrinsic activity by SH reagents mirrors post-translational regulation of enzyme activity. *Biochim Biophys Acta* 1337:175-190, 1997
45. Lenzen S, Tiedge M, Panten U: Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinol (Copenh)* 115:21-29, 1987
46. Lenzen S, Panten U: Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochem Pharmacol* 37:371-378, 1988
47. Ralph EC, Thomson J, Almaden J, Sun S: Glucose modulation of glucokinase activation by small molecules. *Biochemistry* 47:5028-5036, 2008
48. Futamura M, Hosaka H, Kadotani A, Shimazaki H, Sasaki K, Ohyama S, Nishimura T, Eiki J, Nagata Y: An allosteric activator of glucokinase impairs the interaction of glucokinase and glucokinase regulatory protein and regulates glucose metabolism. *J Biol Chem* 281:37668-37674, 2006
49. Lenzen S, Mirzaie-Petri M: Inhibition of aconitase by alloxan and the differential modes of protection of glucose, 3-O-methylglucose, and mannoheptulose. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 346:532-536, 1992
50. Zelent D, Najafi H, Odili S, Buettger C, Weik-Collins H, Li C, Doliba N, Grimsby J, Matschinsky FM: Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas. *Biochem Soc Trans* 33:306-310, 2005
51. Baltrusch S, Lenzen S: Novel insights into the regulation of the bound and diffusible glucokinase in MIN6 beta-cells. *Diabetes* 56:1305-1315, 2007
52. Kanters JA, Schouten A, van Bommel M: Structure of lactitol (4-O-beta-D-galactopyranosyl-D-glucitol) monohydrate: and artificial sweetener. *Acta Crystallogr C* 46 (Pt 12):2408-2411, 1990
53. Uldry M, Thorens B: The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* 447:480-489, 2004
54. Thorens B: Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol* 137:209-238, 1992
55. Chediack JG, Caviedes-Vidal E, Fasulo V, Yamin LJ, Karasov WH: Intestinal passive absorption of water-soluble compounds by sparrows: effect of molecular size and luminal nutrients. *J Comp Physiol B* 173:187-197, 2003

	V_{\max} (U/mg)	$S_{0.5}$ (mmol/l)	n_{Hill}
GK (control)	2.85 ± 0.11	7.26 ± 0.46	1.79 ± 0.09
GK + LY2121260	$4.18 \pm 0.06^{***\#\#\#}$	2.51 ± 0.06	1.59 ± 0.12
GK + Mannoheptulose	$1.64 \pm 0.09^{***}$	$17.9 \pm 1.57^{**}$	1.82 ± 0.20
GK + Mannoheptulose + LY2121260	$1.80 \pm 0.11^{***}$	$29.9 \pm 2.92^{***\#\#\#}$	1.40 ± 0.05
GK + Perseitol	$1.48 \pm 0.13^{***}$	15.1 ± 2.53	1.87 ± 0.16
GK + Perseitol + LY2121260	$2.53 \pm 0.10^{\#\#\#}$	$3.55 \pm 0.43^{\#\#}$	1.39 ± 0.11
GK + Sedoheptulose	2.35 ± 0.05	7.46 ± 0.29	1.85 ± 0.09
GK + Sedoheptulose + LY2121260	$4.15 \pm 0.13^{***\#\#\#}$	2.57 ± 0.16	1.41 ± 0.08

Table 1 Glucokinase kinetic parameters with respect to mannoheptulose, perseitol, sedoheptulose and LY2121260. Data represent means \pm SEM calculated from enzyme activities shown in Fig. 3. *** $p < 0.001$ compared to control; $\#\#$ $p < 0.01$; $\#\#\#$ $p < 0.001$ compared without LY2121260 (ANOVA/ Bonferroni's test).

	V_{\max} (U/mg)	$S_{0.5}$ (mmol/l)	n_{Hill}
GK (control)	2.85 ± 0.11	7.26 ± 0.46	1.79 ± 0.09
GK + LY2121260	4.18 ± 0.06	$2.51 \pm 0.06^{***}$	1.59 ± 0.12
GK + FBPase-2	$4.98 \pm 0.72^*$	7.09 ± 0.27	1.49 ± 0.37
GK + FBPase-2 + LY2121260	$6.49 \pm 0.33^{**\#}$	$1.92 \pm 0.16^{***\#\#\#}$	$0.35 \pm 0.15^{**\#\#}$

Table 2 Glucokinase kinetic parameters with respect to FBPase-2 and LY2121260. Data represent means \pm SEM calculated from measurements shown in Fig. 4. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to control; # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ compared without LY2121260; § $p < 0.05$ compared without FBPase-2 (ANOVA/ Bonferroni's test).

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Structural comparison between mannoheptulose, perseitol and sedoheptulose. Chemical structure of mannoheptulose (A), perseitol (B) and sedoheptulose (C).

Fig. 2. Inhibition of glucokinase enzyme activities by mannoheptulose, perseitol and sedoheptulose. Recombinant beta cell glucokinase was incubated for 5 min with 10, 25, 50 and 100 mmol/l mannoheptulose (A), perseitol (B) and sedoheptulose (C) and after addition of 100 mmol/l glucose enzyme activities were measured spectrophotometrically. Shown are means \pm SEM in U/mg protein from 3 independent experiments. *** $p < 0.001$ compared without compound (ANOVA/ Bonferroni's test).

Fig. 3. Effect of the glucokinase activator LY2121260 on glucokinase enzyme activities in the presence of mannoheptulose, perseitol and sedoheptulose. Recombinant beta cell glucokinase was incubated for 5 min without (black circles, solid line), in the presence of 10 μ mol/l LY2121260 (black circles, dashed line), in the presence of 10 mmol/l mannoheptulose (A), perseitol (B) or sedoheptulose (C) (black square, solid line) or in the presence of both 10 μ mol/l LY2121260 and 10 mmol/l mannoheptulose (A), perseitol (B) or sedoheptulose (C) (black square, dashed line). After addition of the indicated glucose concentration enzyme activities were measured spectrophotometrically. Shown are means \pm SEM in U/mg protein from 3 independent experiments. (D) Comparison of glucokinase enzyme activities in the presence of LY2121260 (white bars) and mannoheptulose, perseitol or sedoheptulose (black bars) measured at 100 mmol/l glucose. ### $p < 0.001$ compared to control; *** $p < 0.001$ compared without LY2121260 (ANOVA/ Bonferroni's test).

Fig. 4. Effect of the glucokinase activator LY2121260 on glucokinase enzyme activities in the presence of FBPase-2. Recombinant beta cell glucokinase was incubated for 5 min without (black circles, solid line) or in the presence of 10 μ mol/l LY2121260 (black circles, dashed line). Recombinant beta cell glucokinase was incubated for 20 min with FBPase-2 in a molar

ratio of 1:5 without (black square, solid line) or in the presence of 10 $\mu\text{mol/l}$ LY2121260 (black square, dashed line). After addition of the indicated glucose concentration enzyme activities were measured spectrophotometrically. Shown are means \pm SEM in U/mg protein from 3 independent experiments. (B) Comparison of glucokinase enzyme activities without (white bar) in the presence of FBPase-2 (black bar) or LY2121260 (grey bars) and both FBPase-2 and LY2121260 (black striped grey bars) measured at 100 mmol/l glucose. *** $p < 0.001$ compared to control; # $p < 0.05$; #### $p < 0.001$ compared without LY2121260; § $p < 0.05$; §§§ $p < 0.001$ compared without FBPase-2 (ANOVA/ Bonferroni's test).

Fig. 5. Effects of the glucokinase activator LY2121260 and mannoheptulose on glucokinase enzyme activities in cell extracts of RINm5F-GK and RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells. Glucokinase enzyme activities were measured spectrophotometrically after sonication of RINm5F-GK cells (A) and RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells (B) and 5 min incubation without (black circles, solid line), in the presence of 10 $\mu\text{mol/l}$ LY2121260 (black circles, dashed line), in the presence of 10 mmol/l mannoheptulose (black square, solid line) or in the presence of both 10 $\mu\text{mol/l}$ LY2121260 and 10 mmol/l mannoheptulose (black square, dashed line). Shown are means \pm SEM in mU/mg cellular protein from 4 independent experiments. (C) Comparison of glucokinase enzyme activities in cell extracts of RINm5F-GK (white bars) and RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 (black bars) cells in the presence of LY2121260 and mannoheptulose measured at 100 mmol/l glucose. ## $p < 0.01$; #### $p < 0.001$ compared to control RINm5F-GK cells; § $p < 0.05$; §§§ $p < 0.001$ compared to control RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells; *** $p < 0.001$ compared with RINm5F-GK cells (ANOVA/ Bonferroni's test).

Fig. 6. Comparison of glucokinase activation by PFK-2/FBPase-2 and LY2121260 and with respect to inhibition through mannoheptulose. (A) Increase in glucokinase enzyme activity resulted by comparison of RINm5F-GK cells with RINm5F-GK cells in the presence of 10 $\mu\text{mol/l}$ LY2121260 (grey bars), RINm5F-GK cells with RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells

(black bars) and RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells with RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells in the presence of 10 $\mu\text{mol/l}$ LY2121260 (black striped grey bars). (B) Decrease in glucokinase enzyme activity resulted by comparison of RINm5F-GK cells with RINm5F-GK cells in the presence of 10 mmol/l mannoheptulose (white bars), RINm5F-GK cells in the presence of both 10 mmol/l mannoheptulose and 10 $\mu\text{mol/l}$ LY2121260 (grey bars), RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells in the presence of 10 $\mu\text{mol/l}$ LY2121260 (black bars) and RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells in the presence of both 10 mmol/l mannoheptulose and 10 $\mu\text{mol/l}$ LY2121260 (black striped grey bars). Calculation based on data presented in Fig. 4.

Fig. 7. Glucokinase-PFK-2/FBPase-2 complex formation in RINm5F cells in dependence upon LY2121260. Protein extracts of RINm5F-GK cells (A) and RINm5F-GK-PFK-2/FBPase-2 cells (B, C) were incubated for 1h with 25 mmol/l glucose alone (A, B) or together with 10 μM LY2121260 (C) and separated by gel filtration chromatography. Glucokinase appearance within the molecular weight fractions was visualized by immunoreactivity and quantified as percentage of total glucokinase protein. Shown are mean values from 3 independent experiments.

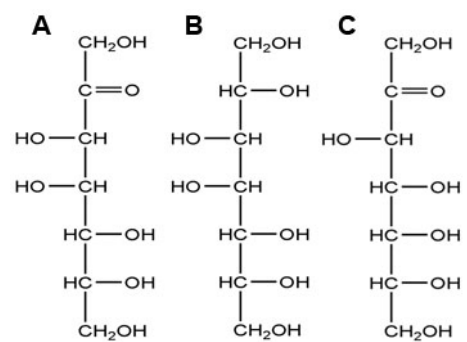
Fig. 1.

Fig. 2.

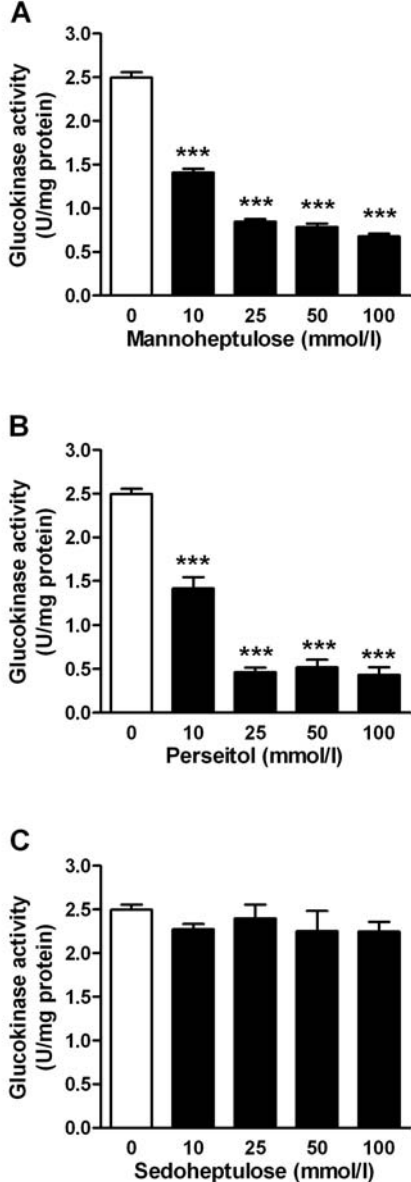


Fig. 3.

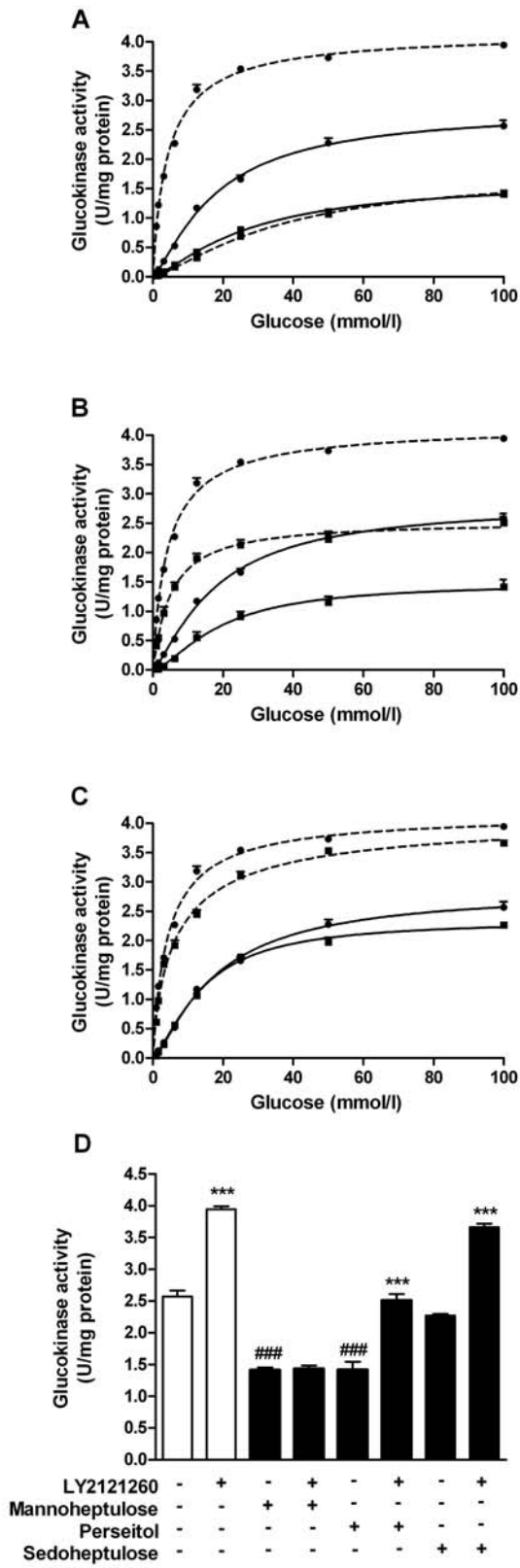


Fig. 4.

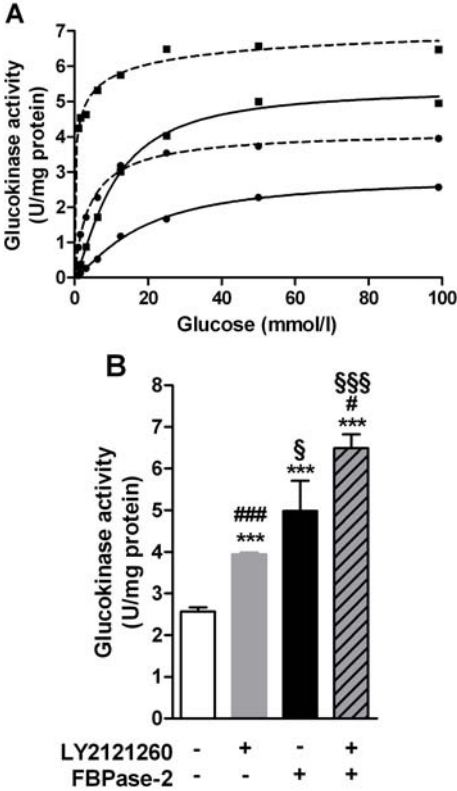


Fig. 5.

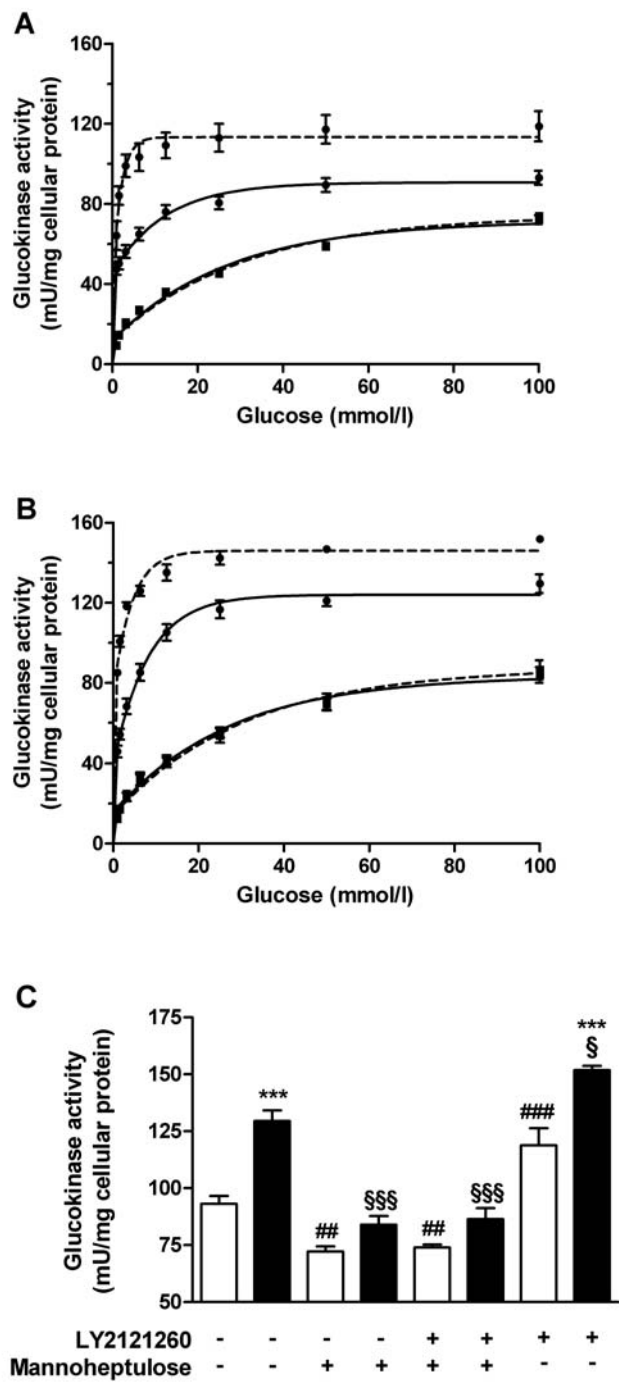


Fig. 6.

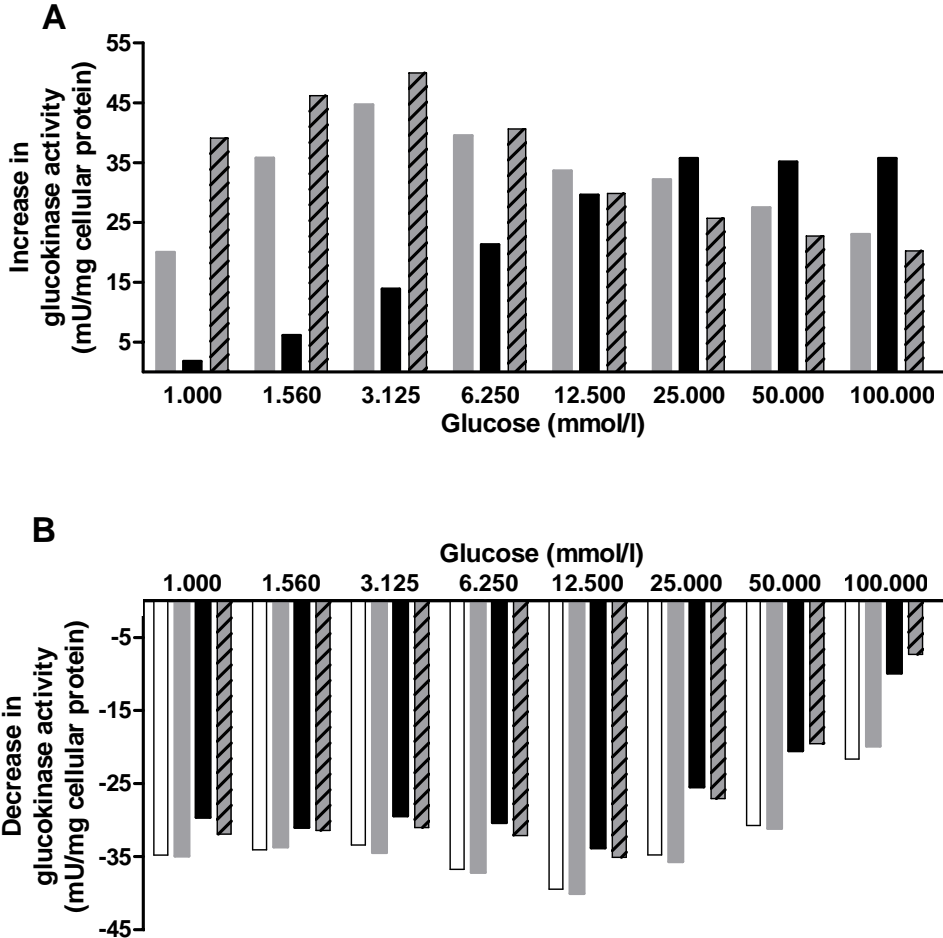
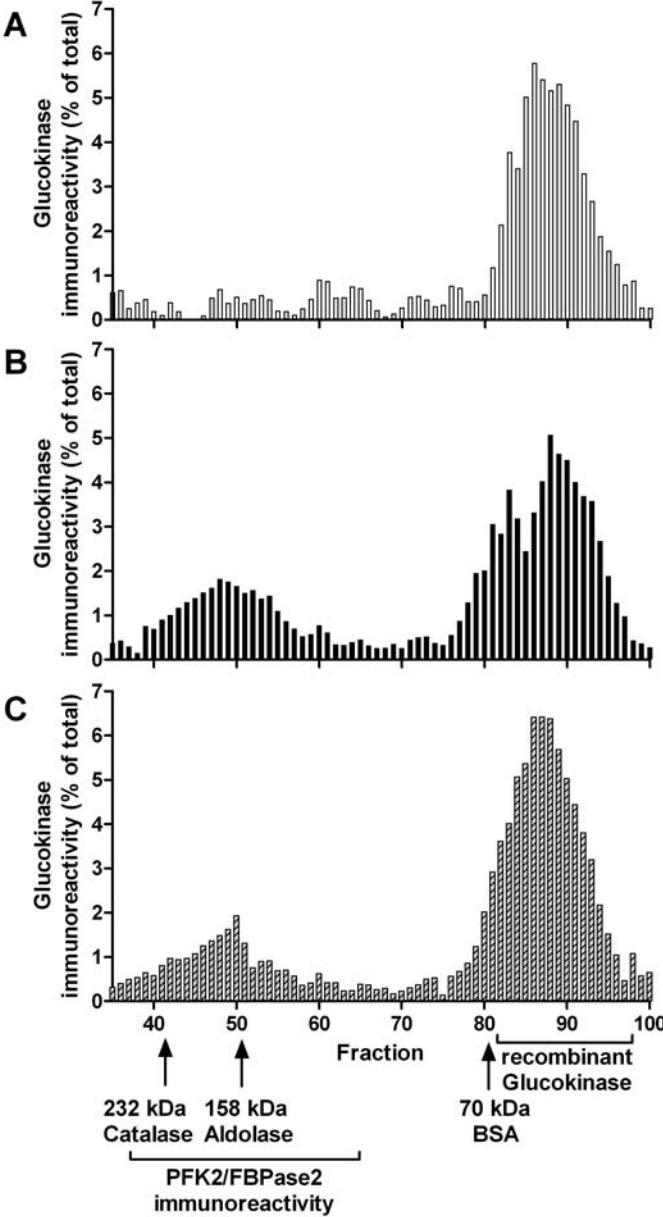


Fig. 7.



Glucokinase mediates coupling of glycolysis to mitochondrial metabolism but not beta-cell damage at high glucose exposure

Running title: Glucose and mitochondrial metabolism

Heike Schmitt¹, Sigurd Lenzen¹ and Simone Baltrusch^{1,2}

¹Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, 30623 Hannover, Germany

²Institute of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of Rostock, 18057 Rostock, Germany

December 2009

Corresponding author:
Prof. Simone Baltrusch
Institute of Medical Biochemistry and Molecular Biology
University of Rostock
D-18057 Rostock
Germany
Tel. 0049-381-494-5760
Fax 0049-381-494-5752
E-mail: simone.baltrusch@med.uni-rostock.de

Abstract

Aims/hypothesis Glucose is the main stimulus of insulin secretion in pancreatic beta-cells. However, high glucose has also been considered to damage the beta-cells. In this study, we examined with special emphasis on the role of the glucose sensor enzyme glucokinase, whether elevated glucose metabolism evokes toxicity to beta-cells.

Methods RINm5F-R-EYFP-GK cells, expressing glucokinase in response to a synthetic inducer and primary rat beta-cells were incubated at different glucose concentrations. Finally glucokinase enzyme activity, glucose-induced insulin secretion, cell viability, and mitochondrial metabolism and heterogeneity were determined.

Results Glucokinase evoked concentration-dependently an increase in glucose-induced insulin secretion from RINm5F-R-EYFP-GK cells. Cell viability was neither affected by glucokinase expression nor decreased by long-term incubation at 30 mmol/l glucose. Interestingly after starvation in response to 10 mmol/l glucose RINm5F-R-EYFP-GK cells pre-cultured at 30 mmol/l glucose and elevated glucokinase expression showed the fastest increase in the mitochondrial membrane potential. Consistently in primary rat beta-cells pre-cultured at 30 mmol/l glucose a significantly faster increase in the mitochondrial membrane potential was observed in comparison to cells pre-cultured at 5 mmol/l. Furthermore pre-culture at 30 mmol/l glucose decreased the mitochondrial membrane potential heterogeneity but not the frequency of mitochondrial dynamics in RINm5F-R-EYFP-GK cells.

Conclusions/Interpretation Our experiments do not support the hypothesis of glucokinase acts as a mediator of cellular toxicity caused by chronically high glucose. In contrast, rather a beneficial effect on glucose-induced insulin secretion after glucokinase expression was observed. Furthermore, glucokinase improved coupling of the glucose stimulus to the mitochondrial metabolism.

Keywords glucokinase, mitochondria, beta cells, insulin secretion, glucotoxicity

Abbreviations:

GK, glucokinase; EYFP, yellow fluorescent protein; JC-1, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide; TMRE, tetramethylrhodamineethylester perchlorate

Introduction

Metabolic stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells is pivotal to maintain whole body glucose homeostasis. The main signalling pathway of glucose-induced insulin secretion in beta-cells is highly coordinated. Glucose recognition is the first and therefore rate-limiting step of this cascade [1-5]. The glucose phosphorylating enzyme glucokinase acts as a glucose sensor. Its main characteristics are low affinity for glucose [4, 6], insensitivity to inhibition by glucose-6-phosphate [7] and flexible conformation resulting in a positive cooperativity [8] [9-11]. Analysing the glucokinase conformation is currently an important aspect of research, since two conformations of glucokinase, namely a closed one and a super-opened one were characterized by its crystal structure [12]. For a comprehensive explanation of glucokinase regulation by glucose and other posttranslational regulators such as the glucokinase activator 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase the existence of three more conformations has been proposed [12-14].

Closure of K_{ATP} channels transmits the signal for insulin exocytosis downstream. Thus, the ATP/ADP ratio is an intermediary key factor in the beta-cell. ATP generation takes place mainly in mitochondria and exhibits extensive interplay with cytoplasmic fuel metabolism. Recent studies indicate that the mitochondrial morphology has an important influence on the metabolic capacity of the organelles. Mitochondria constitute an intracellular network, which is maintained by fusion and fission events and specifically adapted to cell function. Formation of transient or permanent subpopulations and interaction with the cytoskeleton has been described in muscle and fibroblasts [15, 16]. The mitochondrial network in pancreatic beta-cells has been considered to be highly dynamic. Segregation of dysfunctional mitochondria and initiation of their removal by autophagy is another aim of fusion and fission processes and most likely important also in beta-cells [17, 18].

Impairment of beta-cell stimulus-secretion coupling together with peripheral insulin resistance causes hyperglycaemia in type 2 diabetes. Chronically high glucose has been proposed to contribute to beta-cell dysfunction and death [19]. Since type 2 diabetic individuals often suffer also from obesity hyperglycaemia is accompanied by hyperlipidaemia. Lipotoxicity as a result of the high free fatty acid concentration is a widely accepted disease phenomenon in beta-cells [20-22]. A glucose-mediated augmentation of lipotoxicity, termed glucolipotoxicity, is controversially discussed [23, 24]. Especially the contribution of glucose metabolism to beta-cell dysfunction by glucose remains unclear. In some studies glucokinase overexpression in the presence of high glucose concentrations has been shown to cause a collapse of energy metabolism resulting in beta-cell dysfunction [25-27], while in others glucokinase played no role as a mediator of glucotoxicity or was actually protective. Thus, the aim of this study was to elucidate the potential role of glucokinase as a mediator of glucose-induced beta-cell toxicity.

Methods

Inducible overexpression of EYFP-glucokinase in RINm5F cells The RheoSwitch mammalian inducible expression system (New England Biolabs; Beverly, MA) was used for precisely regulated expression of EYFP-glucokinase. This system is based on the highly specific interaction of a synthetic inducer, RheoSwitch Ligand RSL1, and a chimeric bipartite nuclear receptor. The RheoReceptor-1 and RheoActivator expressed by the pNEBR-R1 vector constitute the holoreceptor and regulate transcription of genes cloned into the GAL4 response element expressing pNEBR-X1 vector. For generation of an EYFP-glucokinase fusion protein glucokinase was subcloned into the HindIII and BamHI sites of the pEYFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA) vector. Thereafter the cDNA of EYFP-glucokinase was subcloned into the Sall and BamHI sites of the pNEBR-X1 vector. RINm5F cells were transfected with the pNEBR-R1 vector by the use of jetPEI (Qbiogene, Montreal, Canada) as described in the manufacturer's manual. Positive clones were selected through resistance against G418 (250 µg/ml) and characterized further for adjustable gene expression using the control reporter plasmid pNEBR-X1GLuc (New England Biolabs). The RSL1 concentration dependent induction of the secreted Gaussian luciferase was analyzed by a luminescence assay (Gaussia Luciferase Assay Kit, New England Biolabs). By screening of 10 stable clones that with the highest RSL1 induction ratio was selected for the second transfection with the pNEBR-X1 vector encoding EYFP-glucokinase. Positive clones were selected through resistance against hygromycin (62.5 µg/ml) and characterized further for EYFP-glucokinase expression in living cells by fluorescence microscopy as well as in homogenized cellular fractions by Western blot analyses as described previously [28]. The stable cell clone RINm5F-R-EYFP-GK was used for further experiments and grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10 mmol/l glucose, 10 % (vol/vol) fetal calf serum (FCS), penicillin, streptomycin, 250 µg/ml G418, and 62.5 µg/ml hygromycin in a humidified atmosphere at 37°C and 5 % CO₂.

Measurement of glucokinase enzyme activity RINm5F-R-EYFP-GK cells were seeded in 6-well plates at a density of 500.000 cells per well and cultured for 48 h at 10 mmol/l glucose. For the following 48 h cells were incubated in medium with 1, 10, or 30 mmol/l glucose and 0, 0.5, 62.5, 125, 250, or 500 nmol/l RSL1. Thereafter cells were homogenized by sonication in phosphate buffered saline (pH 7.4) and glucokinase enzyme activity was measured in soluble fractions using an enzyme-coupled photometric assay as described previously [29]. Glucokinase activity was determined by subtracting the hexokinase activity measured at 1 mmol/l glucose from the activity measured at 100 mmol/l glucose and expressed as units per milligram of cellular protein. The protein concentration was quantified by a Bio-Rad protein assay.

Measurement of insulin secretion RINm5F-R-EYFP-GK cells were seeded in 6-well plates at a density of 400.000 cells per well and cultured for 48 h at 10 mmol/l glucose. For the following 48 h cells were incubated in medium with 1, 10, or 30 mmol/l glucose and 0, 0.5, 62.5, 125, 250, or 500 nmol/l RSL1. In long-term experiments before seeding in 96-well plates RINm5F-R-EYFP-GK cells were pre-cultured for 10 days at 10 mmol/l or 30 mmol/l glucose with or without 500 nmol/l RSL1. Finally, cells were incubated for 90 min in bicarbonate-buffered Krebs-Ringer solution without glucose supplemented with 0.1 % albumin and were then stimulated for 2 h with 25 mmol/l glucose. Thereafter 1 ml of the incubation buffer from each well was carefully harvested and gently centrifuged to remove detached cells. In 800 µl of the final supernatants insulin was measured radioimmunologically as described [30].

MTT cell viability assay RINm5F-R-EYFP-GK cells were seeded in 96-well plates at a density of 15.000 cells per well and cultured for 48 h at 10 mmol/l glucose. For the following 48 h cells were incubated in medium with 1, 10, or 30 mmol/l glucose and 0, 0.5, 62.5, 125, 250, or 500 nmol/l RSL1. In addition 0.2 mmol/l palmitic acid (dissolved in 95% ethanol, 1%

(vol/vol) FCS, 0.2% BSA) was added. In long-term experiments before seeding in 96-well plates RINm5F-R-EYFP-GK cells were pre-cultured for 10 days at 10 mmol/l or 30 mmol/l glucose with or without 500 nmol/l RSL1. Finally, the cell viability was calculated using a microtiter plate-based MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay as described [31].

Transfection of RINm5F-R-EYFP-GK cells with pDendra2-Mito For generation of a fusion construct (pDendra2-Mito) consisting of the photoconvertible fluorescent protein Dendra2 and the mitochondrially localized cytochrom-c-oxidase the yellow fluorescent protein (EYFP) in the pEYFP-Mito vector (Clontech, Mountain View, CA) was replaced by Dendra2 from the pDendra2-N vector (Evrogen, Moscow, Russia) using NotI and AgeI restriction sites. For transient transfection RINm5F-R-EYFP-GK cells were seeded at a density of 5×10^4 cells on 35 mm collagen-coated glass bottom dishes (MatTek, Ashland, MA, USA). After 48 h, transfection was performed with 1.5 μ g plasmid DNA and 4 μ l jetPEI (Qbiogene, Montreal, QC, Canada) according to manufacturer's instructions. Thereafter cells were cultured for further 48 h in RPMI medium without or with 500 nmol/l RSL1 and supplemented with 10 mmol/l or 30 mmol/l glucose. Finally, cells were analyzed by fluorescence microscopy.

Measurement of the mitochondrial membrane potential RINm5F-R-EYFP-GK were seeded at a density of 10×10^4 on 35 mm collagen-coated glass bottom dishes (MatTek, Ashland, MA) and cultured for 48 h at 10 mmol/l or 30 mmol/l glucose with or without 500 nmol/l RSL1. Pancreatic islets were isolated from Wistar rats by collagenase digestion and dispersed into cells. Beta-cells were seeded on 35 mm collagen-coated glass bottom dishes (MatTek, Ashland, MA) and cultured for 24 h in RPMI 1640 containing 5 mmol/l glucose, 10 % FCS, penicillin, streptomycin, and gentamycin in a humidified atmosphere at 37°C and 5 % CO₂. For the following 48 h cells were cultured in medium containing either 5 mmol/l or 30 mmol/l glucose. The mitochondrial membrane potential was measured using 5,5',6,6'-tetrachloro-

1,1',3,3-tetraethylbenzimidazolocarboyanine iodide (JC-1) (Sigma, Taufkirchen, Germany). Cells were incubated with JC-1 staining solution (4 mmol/l) for 20 min and washed twice with phosphate buffered saline before the experiment. In addition the mitochondrial membrane potential was measured using tetramethylrhodamineethyl ester perchlorate (TMRE) together with MitoTracker Green (Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies, Eugene, OR, USA). Cells were stained for 30 min with 100 nmol/l MitoTracker Green. Thereafter the medium was changed to remove MitoTracker Green and cells were incubated for 30 min with 12.5 nmol/l TMRE, which was kept in the medium throughout the experiment. To analyze the glucose induced change of mitochondrial membrane potential by fluorescence microscopy cells were at first starved for 90 min and then stimulated with 10 mmol/l glucose (RINm5F-R-EYFP-GK cells) or 20 mmol/l (primary rat beta-cells).

Fluorescence microscopy A cellR/Olympus IX81 inverted microscope system additionally equipped with a Cellcubator (Olympus, Hamburg, Germany) was used as described previously [32]. RINm5F-R-EYFP-GK cells were seeded in 6-well plates at a density of 500.000 cells per well and cultured for 48 h in medium with 10 mmol/l glucose and 0, 0.5, 62.5, 125, 250, or 500 nmol/l RSL1. EYFP fluorescence was determined with a HQ500/20-530DCLP-D560/40 filter set (AHF Analysentechnik, Tübingen, Germany). Glass bottom dishes were fixed on the microscope stage and the mitochondrial membrane potential of primary rat beta-cells and RINm5F-R-EYFP-GK cells were analyzed using JC-1 and HQ470/40-Q495-HQ525/50 and HQ580/20-Q595-HQ630/60 filter sets or TMRE together with MitoTracker Green and a HC dualband filter set with 470/22 and 556/20 excitation filter, respectively. Images were acquired every minute over 40 min. Thereafter, the JC-1 red to green and the TMRE red to MitoTracker Green fluorescence ratio changes were calculated, respectively, using cellR software. Furthermore, glass bottom dishes were fixed on the microscope stage and cells were analyzed with an Olympus Fluoview1000 confocal inverted microscope (Olympus, Hamburg, Germany) and an UPLSAPO 60×1.35 NA oil-immersion

objective (Olympus, Hamburg, Germany). The multi-line argon laser (488 nm) was used to excite green Dendra2 and the krypton–argon laser (561 nm) to excite red Dendra2. Emitted light of green Dendra2 was detected at 490 to 540 nm wavelength range and emitted light of red Dendra2 at 560 to 660 nm. Scanning was performed with 2 μ s/pixel sampling speed and 256 \times 256 image format, resulting in a sampling interval of 0.428 s for a single z-layer and 4.38 s when acquiring eight z-layers with 0.3 μ m spacing. Photoconversion of mitochondrial localized Dendra2 was done for one sampling interval during imaging with simultaneous scanner and a 405 nm laser diode (25 mW) using circular scanning (tornado mode). Cells were maintained in a Cellcubator (Olympus, Hamburg, Germany) during 30 min image acquisition at 60 % humidity, 37°C and 5 % CO₂. Image processing was performed using Olympus FV10-ASW 1.6 software (MediaCybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Statistical analysis Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed by ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparison or Student's t test using the Prism analysis program (Graphpad, San Diego, CA, USA).

Results

Characterisation of the RINm5F-R-EYFP-GK cell line The RheoSwitch system was used to generate a stable insulin-producing RINm5F cell line with inducible expression of an EYFP-glucokinase fusion construct in response to the inducer RSL1. Therefore fast detection of glucokinase protein expression is possible through fluorescence microscopy after maximal induction with 500 nmol/l RSL1 (Fig. 1c, d). In contrast to others, this system is based on a synthetic inducer and no cross talk with endogenous transcription factors can occur. Thus, RINm5F-R-EYFP-GK cells pre-cultured without the inducer RSL1 showed no EYFP-glucokinase expression (Fig. 1a, b).

Glucose-induced insulin secretion in RINm5F-R-EYFP-GK cells RINm5F-R-EYFP-GK cells were cultured for 48 h without or with increasing concentrations (from 0 to 500 nmol/l) of the inducer RSL1. In addition 48 h pre-culture was performed at three different glucose concentrations, namely 1, 10 and 30 mmol/l, and finally fluorescence intensities of the RINm5F-R-EYFP-GK cells were determined. A significant increase of EYFP-glucokinase expression in dependence upon the raising RSL1 concentration was observed at all glucose concentrations (Fig. 2a-c). Indeed in absolute values glucokinase expression induced with 250 nmol/l RSL1 was higher in cells pre-cultured at 10 or 30 mmol/l (Fig. 2b, c) compared to cells pre-cultured at 1 mmol/l glucose (Fig. 2a). Fluorescence intensities (Fig. 2a-c) calculated in living RINm5F-R-EYFP-GK cells correlated with the determined EYFP-glucokinase protein content determined by Western blot analysis (data not shown). Independent from the glucose concentration the increase in EYFP-glucokinase fluorescence in RINm5F-R-EYFP-GK cells was accompanied by an increase in glucokinase enzyme activity (Fig. 2d-f) and finally in glucose-induced insulin secretion (Fig. 2g-i). The increase was significant at induction with 250 and 500 nmol/l RSL1 compared to non-induced cells, respectively. After 90 min starvation and subsequent stimulation with 25 mmol/l glucose for 2 h a twofold increase in

insulin secretion was observed in RINm5F-R-EYFP-GK cells pre-cultured at 10 or 30 mmol/l through maximal glucokinase expression (0 versus 500 nmol/l RSL1). RINm5F-R-EYFP-GK cells pre-cultured at 1 mmol/l glucose showed only a 1.2 fold increase in glucose-induced insulin secretion.

Cell viability of RINm5F-R-EYFP-GK cells The viability of RINm5F-R-EYFP-GK cells was neither impaired by pre-incubation at a lower (1 mmol/l) nor at a higher (30 mmol/l) glucose concentration than 10 mmol/l glucose as commonly used for RINm5F cell culture. Furthermore the higher glucokinase enzyme activity in RSL1 treated cells (500 nmol/l RSL1) did not affect cell viability (Fig. 3a). In contrast the cell viability decreased consistently at all glucose concentrations and glucokinase expression levels by 70% in the presence of 0.2 mmol/l palmitic acid (Fig. 3b). The toxic effect of palmitic acid was comparable to that observed in RINm5F control cells (data not shown).

Prolonged exposure of RINm5F-R-EYFP-GK cells to high glucose To analyze the effect of a chronically elevated glucose concentration RINm5F-R-EYFP-GK cells were pre-incubated for 14 days at 30 mmol/l glucose in the presence of 0 or 500 nmol/l of the inducer RSL1. This extended incubation period did not decrease cell viability of RINm5F-R-EYFP-GK cells (Fig. 4a). Furthermore glucose-stimulated insulin secretion of RINm5F-R-EYFP-GK cells after starvation and subsequent stimulation with 25 mmol/l glucose was comparable (Fig. 4 b) to that observed after the 48 h pre-incubation period at 30 mmol/l glucose (Fig. 3a).

Changes in the mitochondrial membrane potential in RINm5F-R-EYFP-GK and primary beta-cells upon a glucose stimulus The measurement of the cellular mitochondrial membrane potential by the use of JC-1 or TMRE reveals the mitochondrial energy status. Determination of the coordinated up-regulation of both glycolysis and the mitochondrial metabolism upon a cellular glucose rise requires a kinetic analysis of the mitochondrial membrane potential. Quantitative measurements of the mitochondrial membrane potential over a longer time

period with the potentiometric dye JC-1 (Fig. 5a, b), which turns from green monomers to red fluorescence aggregates in the mitochondrial matrix due to the electrochemical membrane potential gradient, has been considered to be at least in part susceptible to photo-bleaching. The increase in the red fluorescence of TMRE (Fig. 6a, b) in dependence upon the electrochemical membrane potential gradient seems to be more bleaching resistant and can be used in combination with the stably incorporated green mitochondrial marker protein MitoTracker Green for long-term quantitative measurements (Fig. 6c). However, both methods revealed in RINm5F-R-EYFP-GK cells after 90 min starvation and subsequent stimulation with 10 mmol/l glucose a significantly higher slope of the mitochondrial membrane potential increase when the glucokinase enzyme activity was elevated (500 nmol/l RSL1) (Fig. 5c and Fig. 6d). Interestingly the increase in the mitochondrial membrane potential was further amplified by pre-culture of RINm5F-R-EYFP-GK cells for 48 h at 30 mmol/l glucose (Fig. 6c). In agreement primary rat beta cells showed after a 48 h pre-incubation at 30 mmol/l glucose also a faster increase in the mitochondrial membrane potential compared to cells pre-incubated at 5 mmol/l glucose (Fig. 6e).

Intracellular heterogeneity of the mitochondrial membrane potential After starvation for 90 min the mean mitochondrial membrane potential of a single cell was comparable in RINm5F-R-EYFP-GK cells pre-incubated at 10 mmol/l glucose (100 ± 2 %) with cells pre-incubated at 10 mmol/l glucose plus 500 nmol/l RSL1 (95 ± 4 %), at 30 mmol/l glucose (101 ± 3 %), or at 30 mmol/l glucose plus 500 nmol/l RSL1 (96 ± 4 %) (data not shown). Additionally the membrane potential was analyzed for single mitochondria within one RINm5F-R-EYFP-GK cell to determine the cellular mitochondrial heterogeneity. After 48 h pre-incubation at 30 mmol/l glucose the mitochondrial heterogeneity was significantly reduced compared to cells pre-incubated at 10 mmol/l glucose (Fig. 7). An elevated glucokinase expression (500 nmol/l RSL1) did not affect the mitochondrial heterogeneity (Fig. 7).

Mitochondrial fission and fusion events in RINm5F-R-EYFP-GK cells In RINm5F-R-EYFP-GK cells the inner mitochondrial membrane was highlighted through green fluorescence of the photoconvertible protein Dendra2 (Fig. 8a). Visualized mitochondrial morphology by Dendra2 in RINm5F-R-EYFP-GK cells was comparable to that observed with MitoTracker Green and thus, well suited to describe mitochondrial dynamics. To determine fission and fusion events of mitochondria Dendra2 in a single mitochondrion was switched to stable red fluorescence by the use of point resolved 405 nm laser light exposure (Fig. 8a). For a comprehensive analysis of the mitochondrial network pictures were taken in eight z-layers to generate 3D images over 30 min. Mitochondrial fusion followed by fission was detected in the same frequency in eight independent experiments each in RINm5F-R-EYFP-GK cells pre-incubated at 10 mmol/l glucose, at 10 mmol/l glucose plus 500 nmol/l RSL1, at 30 mmol/l glucose, or at 30 mmol/l glucose plus 500 nmol/l RSL1. A more fragmented mitochondrial network was observed at all pre-incubation conditions as exemplarily shown for a RINm5F-R-EYFP-GK cell pre-culture at 10 mmol/l glucose for 48 h (Fig. 8a, b). The zoomed 3D images showed after 213 sec a fission event within in the mitochondrial network (Fig. 8b). A complex network with elongated mitochondria is exemplarily shown in a RINm5F-R-EYFP-GK cell after pre-incubation at 30 mmol/l glucose for 48 h (Fig. 8c). Two fusion events were succeeded, the first occurred after 400 sec and the second after 633 sec (Fig. 8c).

Discussion

The crucial role of the pancreatic beta-cells is to maintain whole body glucose homeostasis by secreting the hormone insulin in dependence upon the blood glucose concentration [1, 30]. Type 2 diabetes mellitus is a metabolic disease caused by defective insulin secretion and peripheral insulin resistance and is often accompanied by obesity [23]. Thus, the beta cells of type 2 diabetic individuals are concomitantly exposed to high concentrations of glucose and free fatty acids, both of which have been considered to be toxic to beta-cells [20, 23, 24, 33].

Lipotoxicity in beta-cells has been convincingly documented in different studies in cell culture experiments as well as in vivo. Induction of ER stress response, progressive lipid accumulation and metabolism have been proven as underlying mechanisms of beta-cell dysfunction and death in response to high concentrations of free fatty acids [20-22]. The present results are in agreement with these reports since palmitic acid significantly reduced viability of insulin-producing RINm5F-R-EYFP-GK-cells. Free fatty acid toxicity was not augmented in the presence of high glucose in our experiments, which argues against a concerted action of glucose and free fatty acids towards beta cell dysfunction and cell death. However, both glucolipotoxicity and glucotoxicity alone are controversially discussed to take place in beta-cells [23, 24]. Two aspects have to be taken into account; first, the actual in vivo concentration of glucose and free fatty acids under conditions of type 2 diabetes have not yet been defined conclusively and might be furthermore highly variable in humans; second, in vitro experiments are very useful to determine mechanisms of action of glucose and free fatty acids, but cannot identify communication of signalling pathways between organs, namely adipose tissue, muscle, liver and beta-cells in vivo [24]. However, different studies indicate, that through the overload of fuel the elevated glucose phosphorylation by glucokinase initiates downstream events finally leading to beta-cell damage [25-27]. However, this hypothesis is

not fully convincing in view of the role of glucose as the main stimulus of insulin secretion in pancreatic beta-cells. Thus it was the aim to reconsider this issue in the present studies.

The RheoSwitch Mammalian Inducible Expression System [34], based on a synthetic inducer, was adapted to generate stable insulin-producing RINm5F cells with precise adjustment of EYFP-GK expression. The fluorescence label of glucokinase has no bearing on enzyme function and was useful for a fast detection of protein expression. A direct correlation between the induced glucokinase protein and an increase in its enzyme activity was elucidated in RINm5F-R-EYFP-GK cells. Although protein expression was induced by the same concentration of the inducer a higher EYFP-glucokinase content was observed in cells pre-incubated at high glucose in comparison to cells incubated at low glucose. This interesting result indicates posttranslational intracellular stabilisation of the glucokinase protein. It can be assumed that glucose assisted by the endogenous activator 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase shifts the intracellular equilibrium towards the closed glucokinase conformation and thus, slows down protein degradation.

The viability of RINm5F-R-EYFP-GK cells was neither reduced after pre-incubation at high glucose nor at low glucose. Furthermore, a high glucokinase expression level did not induce toxicity. To mimic the conditions of chronically elevated glucose metabolism RINm5F-R-EYFP-GK cells were incubated for 14 days at high glucose and high glucokinase expression. As glucotoxicity was not observed under prolonged glucose exposure it is likely not a key mediator of beta-cell dysfunction in contrast to lipotoxicity. There are reports showing that an increase of glucose metabolism upon glucokinase expression in INS1 and RIN1046-38 cells resulted in oxidative stress and apoptosis [27, 35]. In contrast to our RINm5F-R-EYFP-GK cells, in these studies far higher levels of glucokinase overexpression were caused by adenoviral transduction. We assume that the high rate of protein biosynthesis in general was deleterious to the beta-cells independently from the specific enzyme function of glucokinase.

Glucokinase expression is low in RINm5F cells. RSL1 induced glucokinase expression in RINm5F-R-EYFP-GK cells is hence within a physiological range and thus more comparable to the situation in primary beta-cells.

However, one key finding of this study is that the increase in glucokinase enzyme activity directly correlated with an increase in glucose-induced insulin secretion. Thus, glucokinase expression has clearly a beneficial effect on glucose-induced insulin secretion. Also at elevated glucose glucokinase seems to be able to contribute to a tight coupling between glycolysis and mitochondrial metabolism, assumed to be important for adequate insulin secretion [36]. To further highlight this, the change of mitochondrial membrane potential induced by glucose stimulation was investigated in RINm5F-R-EYFP-GK cells. Increased glucokinase expression in RINm5F cells or previous exposure to high glucose better transmitted the metabolic signal to the mitochondria resulting in a significantly faster increase of the mitochondrial membrane potential after glucose stimulation. RINm5F-R-EYFP-GK cells exhibited a heterogeneous distribution of the mitochondrial membrane potential, which might be due to differences in intracellular function. After incubation at high glucose, but not through increase of glucokinase expression, this heterogeneity was significantly reduced. Indeed the mean mitochondrial membrane potential of RINm5F-R-EYFP-GK cells was the same independently from the pre-incubation. The glucose induced homogeneity might be explained with a higher degree of mitochondrial network organisation necessary to fulfil fast coupling to glycolysis as determined in RINm5F-R-EYFP-GK cells. At low glucose concentrations some mitochondria are possibly in a resting state with much lower mitochondrial membrane potential. Our results are in agreement with the observation, that in beta-cells the mitochondrial response to glucose is highly variable [37, 38].

Recently it was shown, that mitochondrial dynamics segregates dysfunctional mitochondria and permits their removal by autophagy [11, 17, 18]. Thus, this machinery is especially in

beta-cells vital to maintain mitochondrial metabolism, morphology and ATP generation. Mitochondrial dynamics, namely fission and fusion events [15, 39, 40], were determined by fluorescence microscopy after photoconversion of a single mitochondrion using a Dendra2-cytochrome-c-oxidase fusion construct. A highly dynamic mitochondrial network with frequent fusion and fission events was observed in RINm5F-R-EYFP-GK cells and the mitochondrial morphology was not affected by glucokinase expression. To be able to clearly distinguish between overlaid single mitochondria and interaction between mitochondria, image recording in three dimensions is important. Independently from the glucose concentration frequent fission events were observed in RINm5F-R-EYFP-GK cells. But the resulting greater number of strongly fragmented mitochondria appeared only temporarily and subsequent fusion recovered the network structure. However, a mitochondrial subpopulation not able to fuse has recently been described in INS1 cells [17].

In conclusion, our study did not provide evidence for a glucokinase mediated glucotoxicity in pancreatic beta-cells. Rather, it was demonstrated that glucokinase promotes the coupling between glycolysis and mitochondrial metabolism essential for glucose-induced insulin secretion. The regulation of the mitochondrial network seems to be involved in this process and thus, has to be further analyzed also with respect to its dysfunction in type 2 diabetes mellitus. For this purpose the developed microscopic technique newly established in this study might be useful.

Acknowledgements

This work has been supported by the European Union (Integrated Project EuroDia LSHM-CT-2006-518153 in the Framework Programme 6 [FP6] of the European-Community).

Duality of interest

The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

References

- [1] Lenzen S (1992) Glucokinase: signal recognition enzyme for glucose-induced insulin secretion. In: Flatt PRe (ed) Nutrient regulation of insulin secretion. Portland Press, London and Chapel Hill, pp 101-125
- [2] Tiedge M, Krug U, Lenzen S (1997) Modulation of human glucokinase intrinsic activity by SH reagents mirrors post-translational regulation of enzyme activity. *Biochimica et biophysica acta* 1337: 175-190
- [3] Baltrusch S, Lenzen S (2007) Novel insights into the regulation of the bound and diffusible glucokinase in MIN6 beta-cells. *Diabetes* 56: 1305-1315
- [4] Lenzen S, Panten U (1988) Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochemical pharmacology* 37: 371-378
- [5] Zelent D, Golson ML, Koeberlein B, et al. (2006) A glucose sensor role for glucokinase in anterior pituitary cells. *Diabetes* 55: 1923-1929
- [6] Matschinsky FM (1990) Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39: 647-652
- [7] Middleton RJ (1990) Hexokinases and glucokinases. *Biochemical Society transactions* 18: 180-183
- [8] Matschinsky F, Liang Y, Kesavan P, et al. (1993) Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *The Journal of clinical investigation* 92: 2092-2098
- [9] Cardenas ML (1997) Kinetic behaviour of vertebrate hexokinases with emphasis on hexokinase D (IV). *Biochemical Society transactions* 25: 131-135
- [10] Cornish-Bowden A, Storer AC (1986) Mechanistic origin of the sigmoidal rate behaviour of rat liver hexokinase D ('glucokinase'). *The Biochemical journal* 240: 293-296
- [11] Mouli PK, Twig G, Shirihai OS (2009) Frequency and selectivity of mitochondrial fusion are key to its quality maintenance function. *Biophysical journal* 96: 3509-3518
- [12] Kamata K, Mitsuya M, Nishimura T, Eiki J, Nagata Y (2004) Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* 12: 429-438

- [13] Zhang J, Li C, Chen K, Zhu W, Shen X, Jiang H (2006) Conformational transition pathway in the allosteric process of human glucokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 13368-13373
- [14] Antoine M, Boutin JA, Ferry G (2009) Binding kinetics of glucose and allosteric activators to human glucokinase reveal multiple conformational states. *Biochemistry* 48: 5466-5482
- [15] Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R (2009) The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41: 1928-1939
- [16] Kuznetsov AV, Usson Y, Leverve X, Margreiter R (2004) Subcellular heterogeneity of mitochondrial function and dysfunction: evidence obtained by confocal imaging. *Molecular and cellular biochemistry* 256-257: 359-365
- [17] Twig G, Elorza A, Molina AJ, et al. (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal* 27: 433-446
- [18] Twig G, Hyde B, Shirihai OS (2008) Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochimica et biophysica acta* 1777: 1092-1097
- [19] Kim WH, Lee JW, Suh YH, et al. (2005) Exposure to chronic high glucose induces beta-cell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54: 2602-2611
- [20] Bollheimer LC, Skelly RH, Chester MW, McGarry JD, Rhodes CJ (1998) Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. *The Journal of clinical investigation* 101: 1094-1101
- [21] Cnop M, Hannaert JC, Gruppig AY, Pipeleers DG (2002) Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification. *Endocrinology* 143: 3449-3453
- [22] Kelpe CL, Moore PC, Parazzoli SD, Wicksteed B, Rhodes CJ, Poitout V (2003) Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *The Journal of biological chemistry* 278: 30015-30021
- [23] Cnop M (2008) Fatty acids and glucolipototoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochemical Society transactions* 36: 348-352

- [24] Poitout V (2008) Glucolipototoxicity of the pancreatic beta-cell: myth or reality? *Biochemical Society transactions* 36: 901-904
- [25] Brock B, Mogensen JH, Gregersen S, Hermansen K (2002) Glucose desensitization in INS-1 cells: evidence of impaired function caused by glucose metabolite(s) rather than by the glucose molecule per se. *Metabolism: clinical and experimental* 51: 671-677
- [26] Faradji RN, Havari E, Chen Q, et al. (2001) Glucose-induced toxicity in insulin-producing pituitary cells that coexpress GLUT2 and glucokinase. Implications for metabolic engineering. *The Journal of biological chemistry* 276: 36695-36702
- [27] Wang H, Iynedjian PB (1997) Acute glucose intolerance in insulinoma cells with unbalanced overexpression of glucokinase. *The Journal of biological chemistry* 272: 25731-25736
- [28] Baltrusch S, Lenzen S, Okar DA, Lange AJ, Tiedge M (2001) Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner. *The Journal of biological chemistry* 276: 43915-43923
- [29] Lenzen S, Tiedge M, Flatt PR, Bailey CJ, Panten U (1987) Defective regulation of glucokinase in rat pancreatic islet cell tumours. *Acta endocrinologica* 115: 514-520
- [30] Lenzen S (1979) Insulin secretion by isolated perfused rat and mouse pancreas. *The American journal of physiology* 236: E391-400
- [31] Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S (1997) Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46: 1733-1742
- [32] Baltrusch S, Lenzen S (2008) Monitoring of glucose-regulated single insulin secretory granule movement by selective photoactivation. *Diabetologia* 51: 989-996
- [33] Liu YQ, Tornheim K, Leahy JL (1998) Shared biochemical properties of glucotoxicity and lipotoxicity in islets decrease citrate synthase activity and increase phosphofructokinase activity. *Diabetes* 47: 1889-1893
- [34] Palli SR, Kapitskaya MZ, Kumar MB, Cress DE (2003) Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system. *Eur J Biochem* 270: 1308-1315

- [35] Wu L, Nicholson W, Knobel SM, et al. (2004) Oxidative stress is a mediator of glucose toxicity in insulin-secreting pancreatic islet cell lines. *The Journal of biological chemistry* 279: 12126-12134
- [36] Malmgren S, Nicholls DG, Taneera J, et al. (2009) Tight coupling between glucose and mitochondrial metabolism in clonal beta-cells is required for robust insulin secretion. *The Journal of biological chemistry* 284: 32395-32404
- [37] Heart E, Corkey RF, Wikstrom JD, Shirihai OS, Corkey BE (2006) Glucose-dependent increase in mitochondrial membrane potential, but not cytoplasmic calcium, correlates with insulin secretion in single islet cells. *American journal of physiology* 290: E143-E148
- [38] Wikstrom JD, Katzman SM, Mohamed H, et al. (2007) beta-Cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels. *Diabetes* 56: 2569-2578
- [39] Chan DC (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annual review of cell and developmental biology* 22: 79-99
- [40] Rossignol R, Karbowski M (2009) Editorial of the directed issue on mitochondrial dynamics in biology and medicine. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41: 1748-1749

Figure legends

Fig. 1 Inducible overexpression of EYFP-glucokinase in RINm5F cells. RINm5F-R-EYFP-GK cells, generated using the RheoSwitch system were pre-cultured without (**a, b**) and with 500 nmol/l of the inducer RSL1 for EYFP-glucokinase expression (**c, d**). Typical transmitted light images (**a, c**) and corresponding fluorescence images (**b, d**) of RINm5F-R-EYFP-GK cells from four independent experiments are shown. Scale bar 20 μm .

Fig. 2 Effects of the glucokinase expression level on glucose induced insulin-secretion of RINm5F cells pre-incubated at different glucose concentrations. RINm5F-R-EYFP-GK cells were pre-cultured for 48 h without or in the presence of 0.5, 62.5, 125, 250 and 500 nmol/l of the inducer RSL1. Cells were pre-cultured in RPMI medium supplemented with 1mmol/l glucose (open bars, **a, d, g**), with 10 mmol/l glucose (grey bars, **b, e, h**) or with 30 mmol/l glucose (black bars, **c, f, i**). Thereafter either fluorescence intensity of EYFP-glucokinase was determined by fluorescence microscopy in living cells (**a-c**), glucokinase enzyme activity was measured spectrophotometrically in homogenized cells (**d-f**) or insulin secretion after 90 min starvation and subsequent stimulation with 25 mmol/l glucose was analyzed by static cell incubation (**g-i**). Shown are mean values \pm SEM from (**a-c**) four, (**d-f**) seven, and (**g-i**) four independent experiments. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ (ANOVA/Bonferroni's test).

Fig. 3 Effects of the glucokinase expression level on the cell viability of RINm5F cells pre-incubated at different glucose concentrations and in combination with palmitic acid. RINm5F-R-EYFP-GK cells were pre-incubated for 48 h in the absence or in the presence of raising concentrations of the inductor RSL1 in medium supplemented with 1 mmol/l (open bars), 10 mmol/l (grey bars) or 30 mmol/l (black bars) glucose alone (**a**) or in the presence of 0.2 mmol/l palmitic acid (**b**). Thereafter cell viability was determined using a microtitre plate-based MTT assay. Values are given in percentage of cells pre-cultured at 10 mmol/l glucose

without RSL1 and palmitic acid. Shown are mean values \pm SEM from four independent experiments.

Fig. 4 Effects of chronically high glucose culture and glucokinase expression on cell viability and insulin secretion of RINm5F cells. RINm5F-R-EYFP-GK cells were pre-cultured for 14 days at 10 mmol/l (grey bars) and 30 mmol/l (black bars) glucose either in the absence (-) or in the presence of 500 nmol/l RSL1 (+). Thereafter either cell viability was determined by MTT assay (**a**) or insulin secretion after 90 min starvation and subsequent stimulation with 25 mmol/l glucose was analyzed by static cell incubation (**b**). Values are given as percentage of cells pre-cultured at 10 mmol/l glucose without RSL1. Shown are mean values \pm SEM from three independent experiments. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; (ANOVA/Bonferroni's test).

Fig. 5 Characterisation of the mitochondrial membrane potential in RINm5F cells using the potentiometric dye JC-1. RINm5F-R-EYFP-GK cells were pre-cultured for 48 h in RPMI medium supplemented with 10 mmol/l glucose and with 0 or 500 nmol/l RSL1. Initially RINm5F-R-EYFP-GK cells were stained with JC-1 and starved for 90 min. After addition of 10 mmol/l glucose cells were imaged every minute over 40 min. The slope of JC-1 red to green fluorescence ratio change of individual cells was calculated. A typical image of EYFP fluorescence as an overlay on the transmitted light (**a**) and the corresponding JC-1 staining (**b**) of RINm5F-R-EYFP-GK cells were shown. Scale bar 10 μ m. (**c**) Slope of JC-1 ratio change of RINm5F-R-EYFP-GK cells with (+) and without (-) RSL1 treatment. Shown are mean values \pm SEM from three independent experiments. * $p < 0.05$; (Student's t test).

Fig. 6 Effects of high glucose culture and glucokinase expression on the glucose-induced mitochondrial membrane potential increase of RINm5F cells. The increase in the mitochondrial membrane potential was quantified by the use of TMRE in combination with the stable mitochondrially localized dye MitoTracker Green. A typical image of EYFP

fluorescence as an overlay on the transmitted light **(a)** and the corresponding TMRE and MitoTracker Green staining **(b)** of RINm5F-R-EYFP-GK cells were shown. Scale bar 10 μ m. RINm5F-R-EYFP-GK cells were pre-cultured for 48 h. Initially RINm5F-R-EYFP-GK cells were stained with MitoTracker Green and TMRE and starved for 90 min. After addition of 10 mmol/l glucose cells were imaged every minute over 40 min. The slope of the TMRE red to MitoTracker Green fluorescence ratio change of individual cells was calculated as shown exemplarily **(c)**. The slope of ratio change was determined in RINm5F-R-EYFP-GK pre-cultured either at 10 mmol/l (grey bars) or at 30 mmol/l (black bars) glucose and without (-) or in the presence (+) of 500 nmol/l RSL1 **(d)**. Shown are mean values \pm SEM from three independent experiments. *** p <0.001; (ANOVA/Bonferroni's test). Primary rat beta cells were pre-cultured for 48 h either at 5 mmol/l (grey bars) or at 30 mmol/l (black bars) glucose. After starvation for 90 min cells were stimulated with 20 mmol/l glucose and the increase in the mitochondrial membrane potential was analyzed as TMRE/ MitoTracker Green ratio change **(e)**. Shown are mean values \pm SEM from three independent experiments. ** p <0.01; (Student's t test).

Fig. 7 Effects of high glucose culture and glucokinase expression on the mitochondrial membrane potential heterogeneity within single RINm5F cells. RINm5F-R-EYFP-GK cells were pre-cultured for 48 h either at 10 mmol/l (grey bars) or at 30 mmol/l (black bars) glucose and in the absence (-) or in the presence (+) of 500 nmol/l RSL1. Cells were stained with MitoTracker Green and TMRE and starved 90 min before image acquisition. The TMRE red to MitoTracker Green fluorescence ratio of 10 to 20 individual mitochondria was calculated and the intracellular variation of at least 38 cells was determined. Shown are mean values \pm SEM from three to six independent experiments. *** p <0.001; (ANOVA/Bonferroni's test).

Fig. 8 Analysis of mitochondrial fission and fusion events in RINm5F cells. RINm5F-R-EYFP-GK cells were transiently transfected with Dendra2-Mito and cultured for 48 h in

RPMI medium supplemented with 10 mmol/l (**a, b**) or 30 mmol/l (**c**) glucose. Region selected 405 nm laser light exposure during 3D image acquisition resulted in photoconversion of a single mitochondrion from green to red. Thereafter cells were imaged over 30 min. (**a**) A typical 3D image before (**1**) and after (**2**) photoconversion is shown. (**b**) Time series (**1-6**) of zoomed 3D images highlighted alteration and movement of the red photoconverted mitochondrion within the cell. Fission of the selected mitochondrion becomes visible after 213 sec (**4**). (**c**) Time course (**1-30**) of a cellular mitochondrial network is shown in 3D images. Two fusion events were accessible during image acquisition through initial photoconversion of a single mitochondrion. The first fusion event occurred after 400 sec (**11**) and the second one after 633 sec (**27**). Cells shown are representative of six independent experiments each. Grid size 1 μm .

Fig. 1

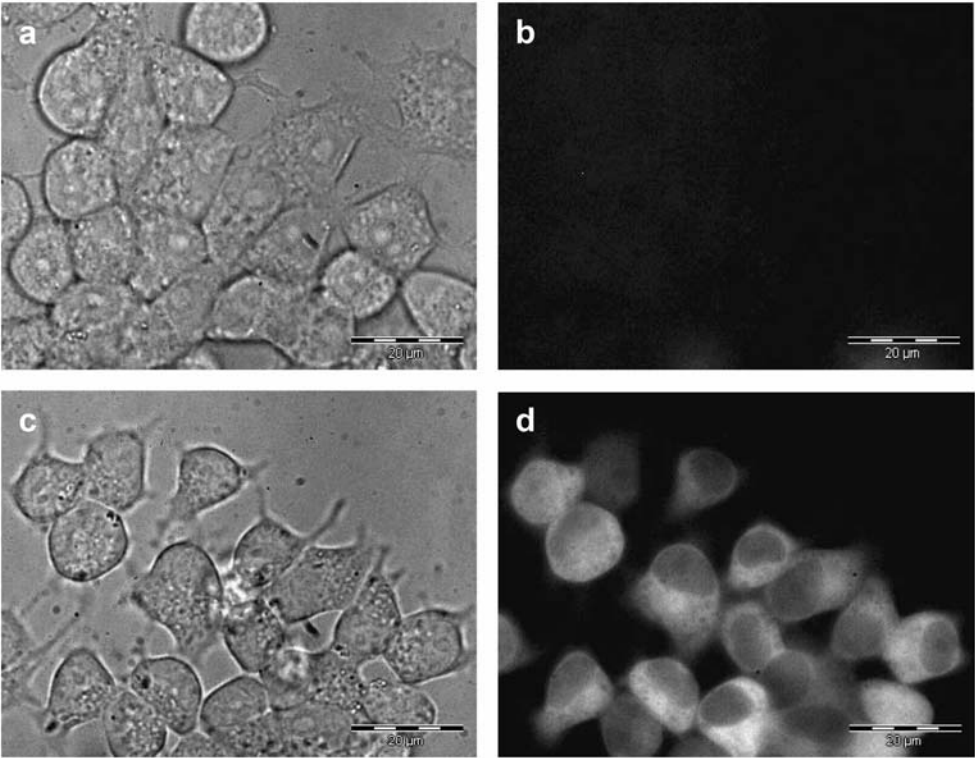


Fig. 2

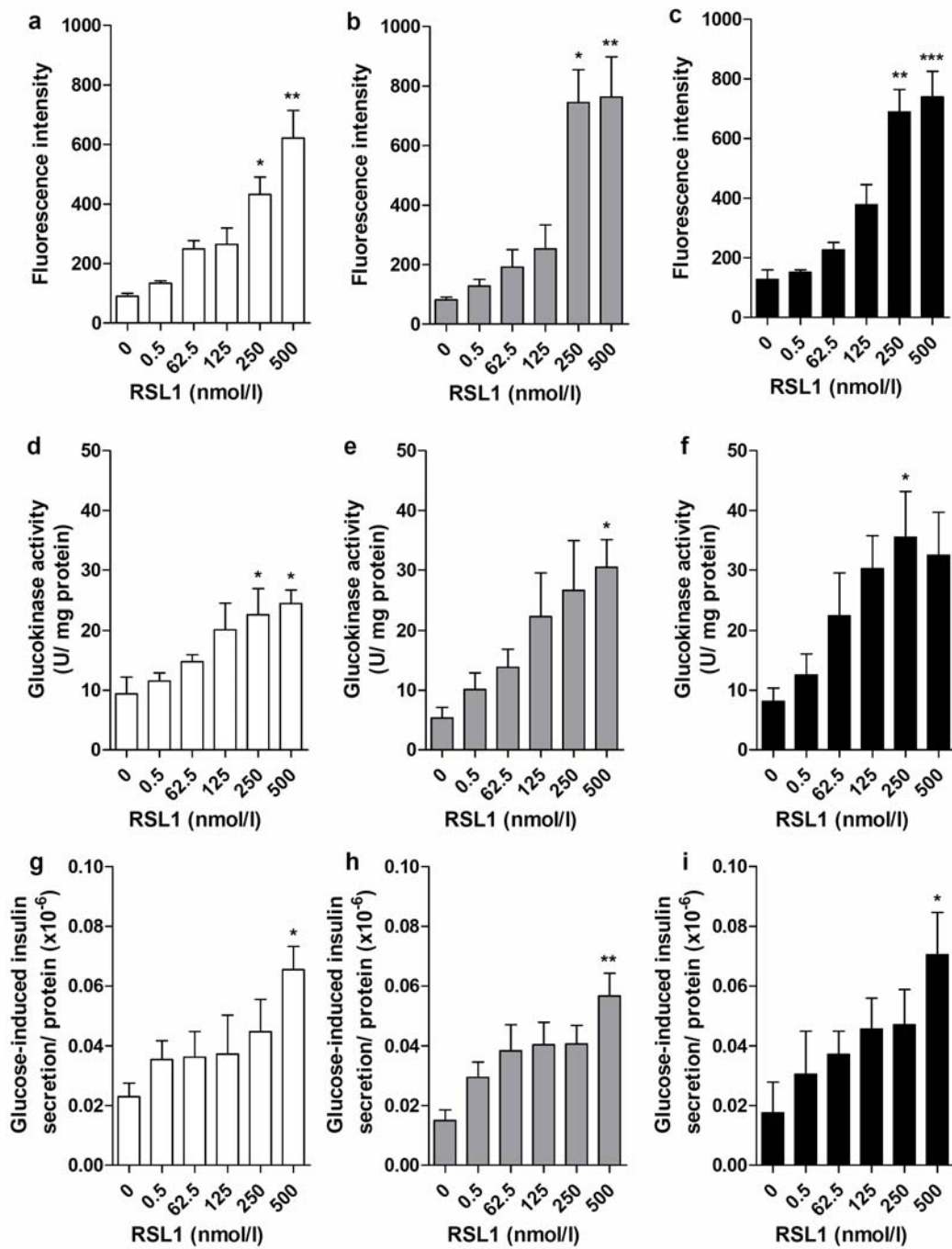


Fig. 3

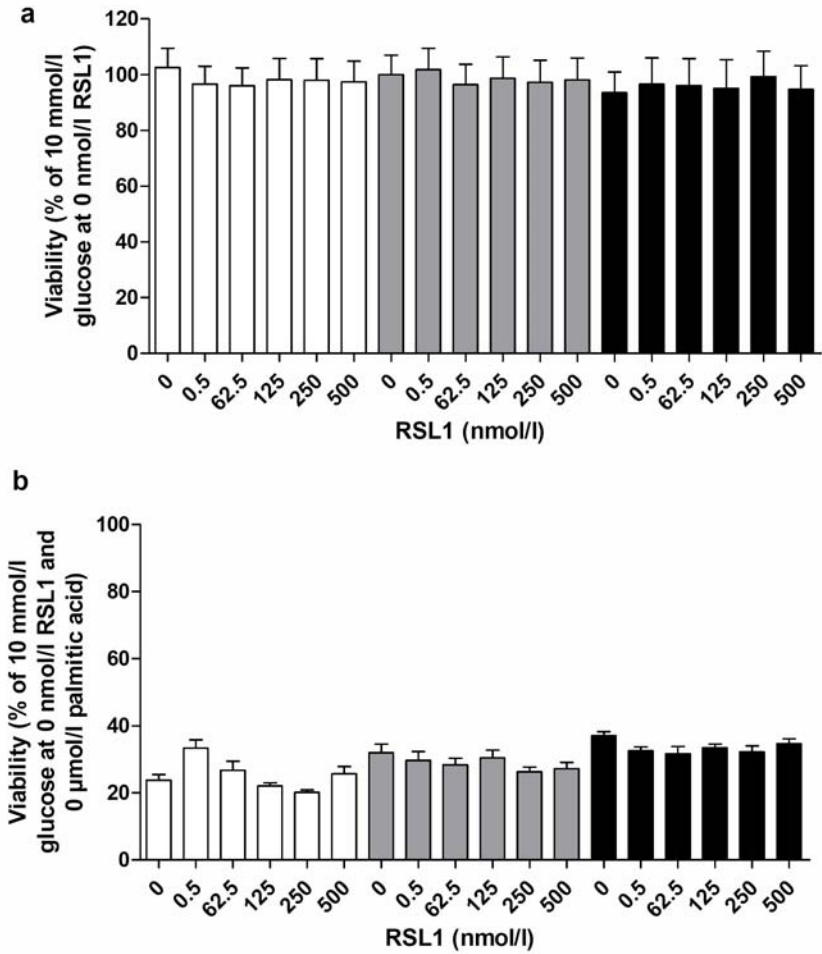


Fig. 4

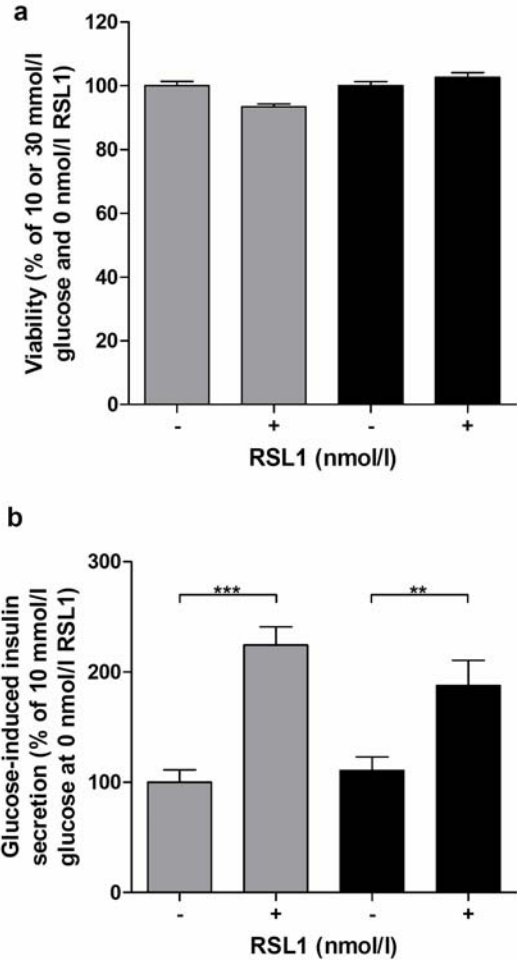


Fig. 5

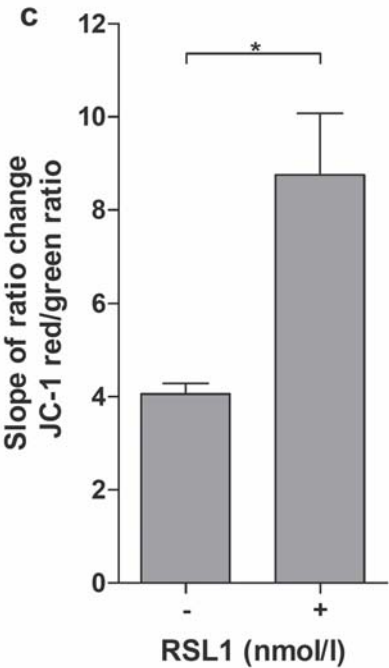
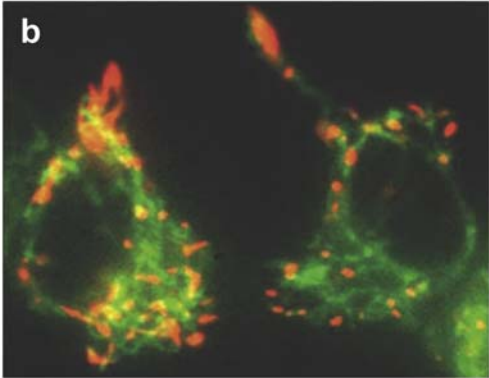
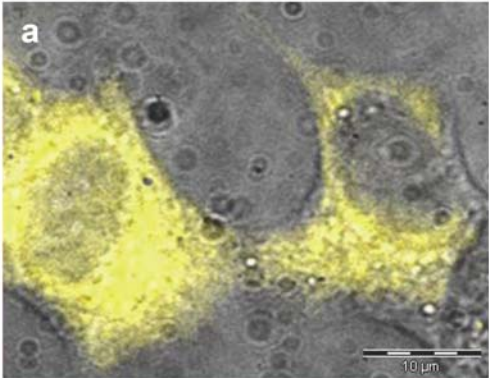


Fig. 6

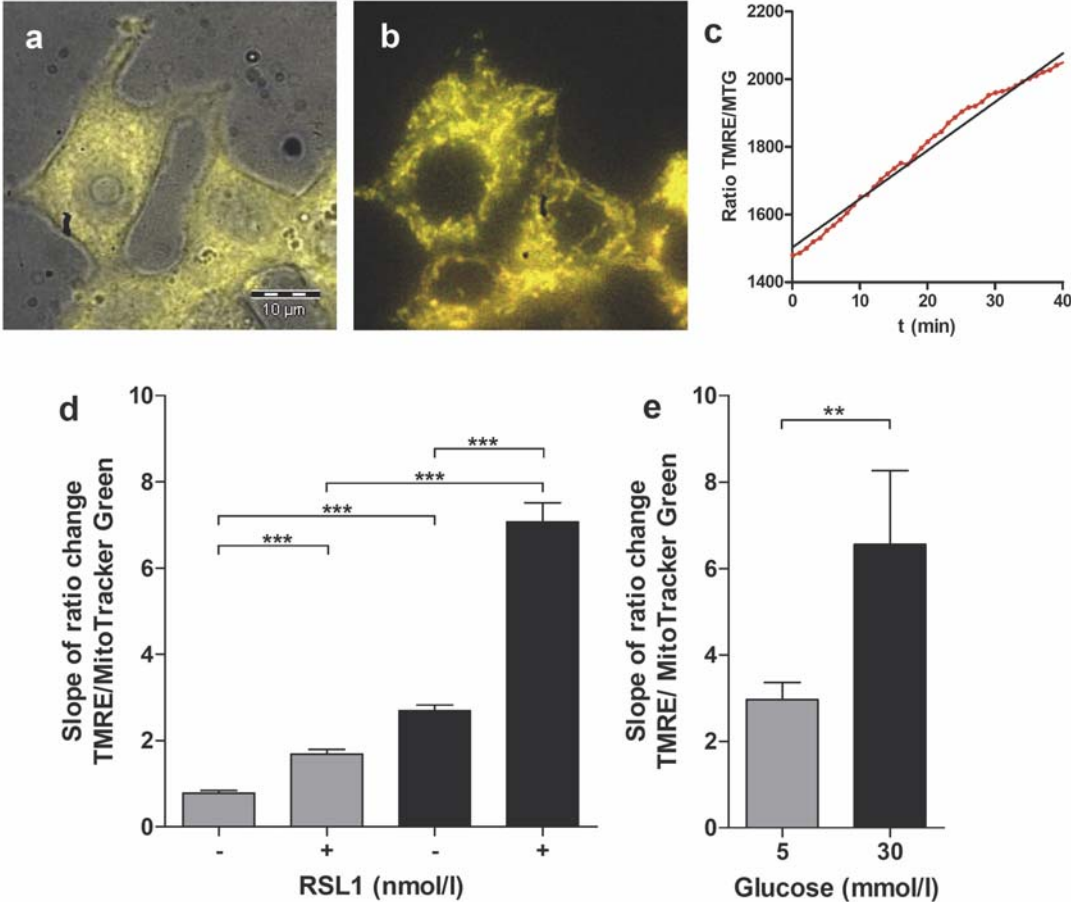


Fig. 7

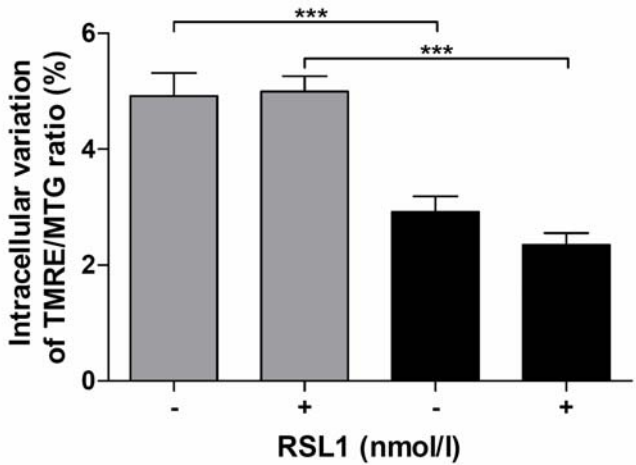


Fig. 8a

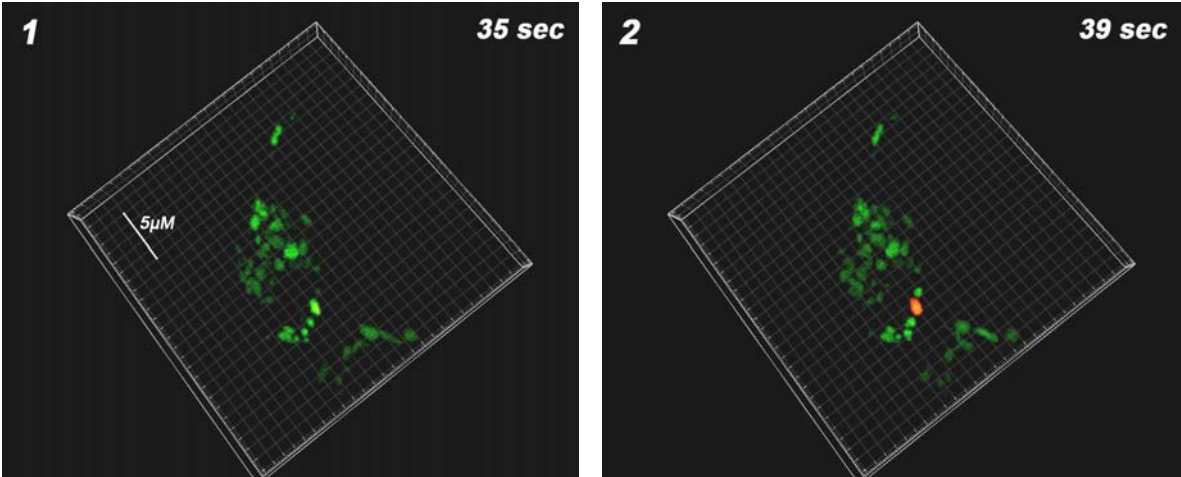


Fig. 8b

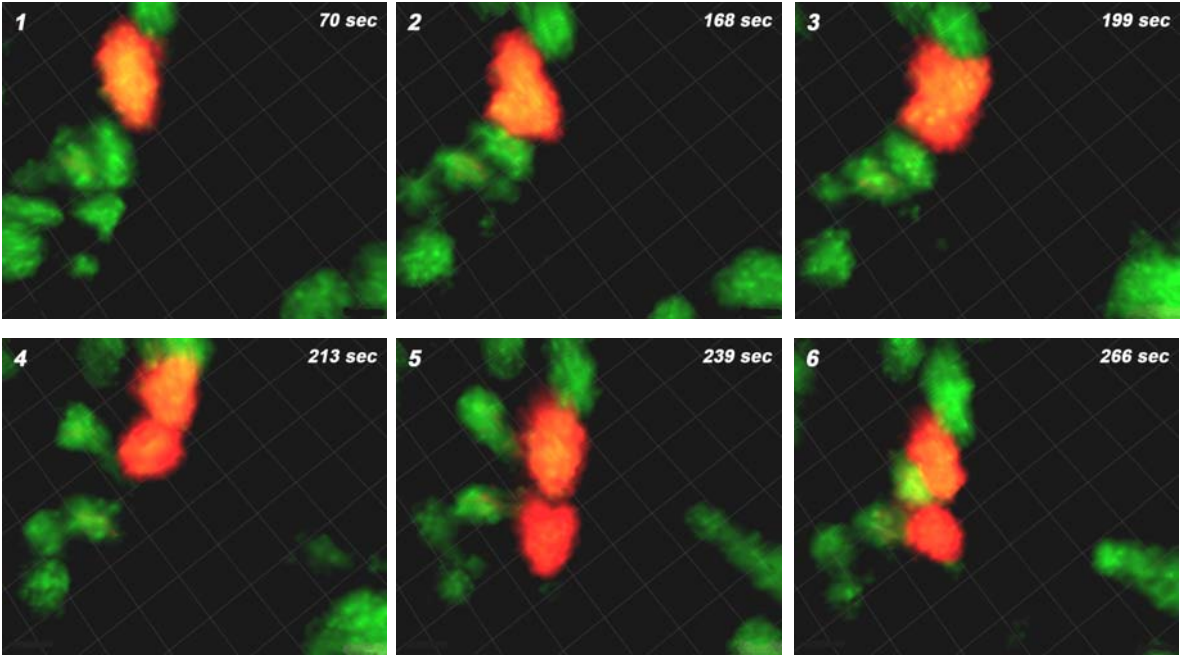
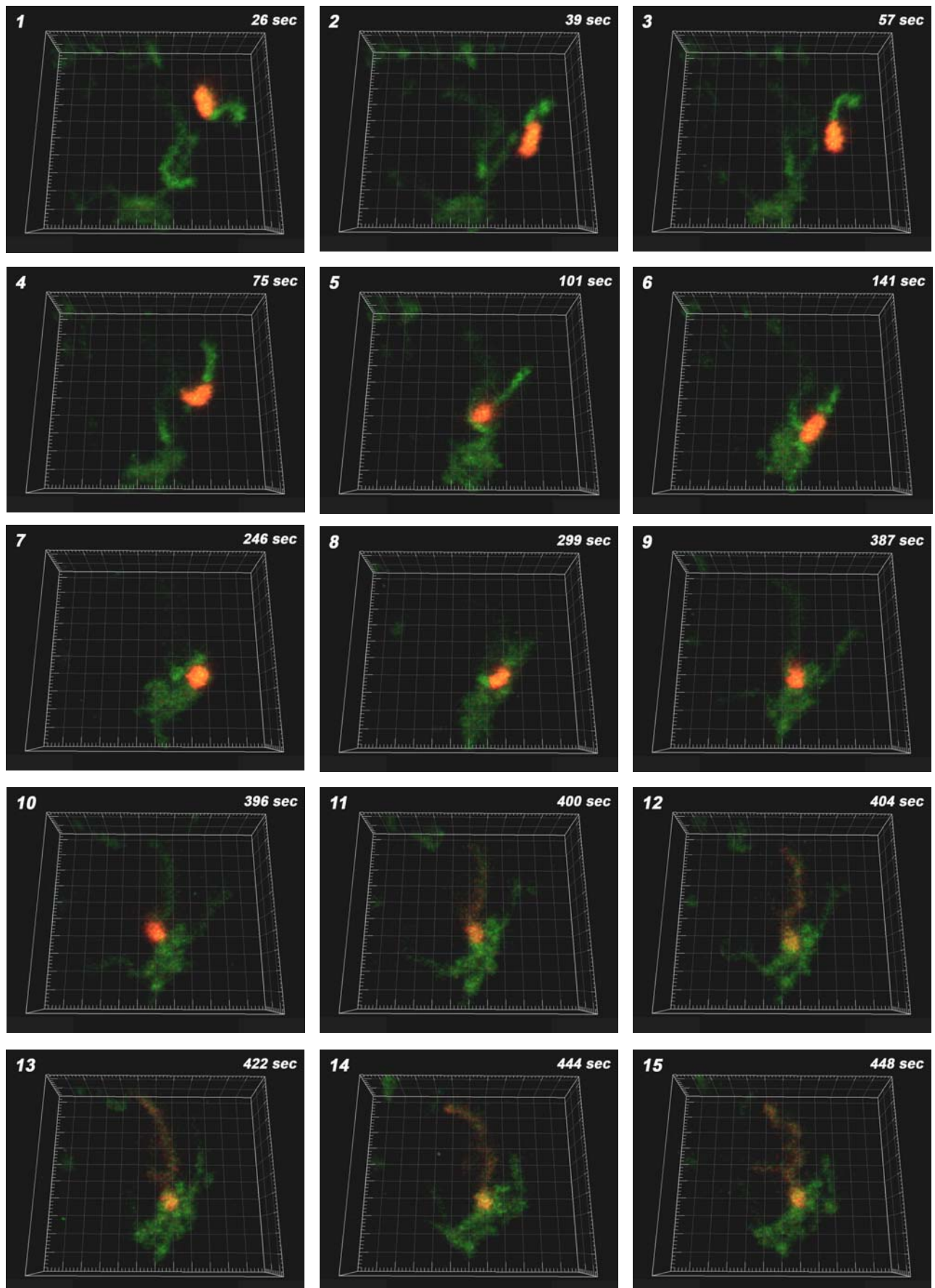


Fig. 8c



3 Diskussion

Der Typ 2 Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die sowohl durch eine Insulinresistenz der Zielorgane, als auch durch einer Sekretionsstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen des Pankreas charakterisiert ist und zur Hyperglykämie führt. Die weltweit deutliche Zunahme der Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus stellt eine Herausforderung für die Medizin und Forschung dar. Daher ist es wichtig, die molekularen Mechanismen, die zur Dysregulation des Glucosestoffwechsels führen aufzuklären. Die metabolische Stimulus-Sekretionskopplung in den Beta-Zellen des Pankreas sorgt für die Aufrechterhaltung der Blutglucosehomöostase im Organismus. Das niedrigaffine glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase koppelt die extrazelluläre Glucosekonzentration an glykolytische Fluxänderungen und ist daher das Signalerkennungsenzym für die Auslösung der glucoseinduzierten Insulinsekretion (Lenzen & Panten 1988; Matschinsky 1990; Lenzen 1992). Das Verständnis der Glucokinaseregulation in den Beta-Zellen des Pankreas ist daher für die Forschung von großem Interesse. Zudem stellt die Glucokinase eine vielversprechende Zielstruktur für eine Therapie des Typ 2 Diabetes mellitus dar und chemisch synthetisierte Glucokinase-Aktivatoren, wie sie kürzlich beschrieben wurden (Grimsby *et al.* 2003; Brocklehurst *et al.* 2004; Efanov *et al.* 2005; Leighton *et al.* 2005; Printz & Granner 2005; Guertin & Grimsby 2006; Matschinsky 2009), könnten eine krankheitsbedingt erhöhte Blutglucosekonzentration normalisieren.

3.1 Isolierung und Aufreinigung von Mannoheptulose aus der Avocado über ein kombiniertes Verfahren aus Biotransformation und Chromatographie

Ein bekannter spezifischer kompetitiver Inhibitor des Enzyms Glucokinase ist die Heptulose Mannoheptulose, die aufgrund ihrer Struktur nicht von der Glucokinase phosphoryliert werden kann. Die Methode der Isolation von Mannoheptulose aus der Avocado, die erstmals 1917 von La Forge beschrieben wurde (La Forge 1917), konnte leicht modifiziert reproduziert und mit einem kombinierten Verfahren aus einer Biotransformation und einer präparativen Chromatographie ergänzt werden (Kappler-Tanudyaya *et al.* 2007). Das neu entwickelte Extraktionsverfahren stellt eine effiziente und schnelle Methode der Mannoheptuloseextraktion aus der Avocado dar. Die Ausbeute an Mannoheptulose in dem isolierten reinen Extrakt beträgt 73% des löslichen Mannoheptulosegehalts der eingesetzten Avocados. Die von La Forge etablierte einfache und kostengünstige Methode der Proteinfällung durch Ethanol wurde beibehalten, um einen Mannoheptuloseextrakt zu gewinnen. Einige

nachfolgende arbeitsintensive Schritte wurden jedoch optimiert, wie z.B. der Einsatz eines Zentrifugationsschritts anstatt der zeitaufwendigen Filtration des fetthaltigen Avocado-Extrakts. Die Ausbeute an Mannoheptulose konnte durch mehrere aufeinanderfolgende Extraktionsschritte um 30% gesteigert werden. Keine weitere Erhöhung des finalen Mannoheptulosegehalts wurde durch Verfahren die dem Zellaufschluss dienen (Ultraschall, Extraktion bei erhöhter Temperatur oder variierendem pH-Wert, Verlängerung der Extraktionsdauer) erreicht. Weitere Komponenten des gewonnenen Mannoheptuloseextrakts sind der Zuckeralkohol Perseitol und in geringeren Mengen weitere Monosaccharide wie Glucose und Fructose (Liu *et al.* 2002). Glucose und Fructose konnten durch den Zusatz von Hefe, die die Monosaccharide Glucose und Fructose verstoffwechselt, vollständig aus dem Extrakt entfernt werden. Anschließend konnte der Extrakt über eine präparative Chromatographie in zwei Fraktionen mit nahezu 100%iger Reinheit an Mannoheptulose bzw. Perseitol aufgetrennt werden. Die Vakuum-Gefriertrocknung des Extrakts resultierte allerdings in einer eher zähen Substanz und nicht in einer vollständig auskristallisierten Substanz. Es gelang mit dieser Methode nicht, die Flüssigkeit komplett aus dem Extrakt zu entfernen. Die natürliche grün-braune Färbung des Extrakts konnte weitgehend eliminiert werden, eine rein weiße Färbung der Mannoheptulose konnte jedoch nicht erreicht werden. Aus 1 kg Avocados wurden letztendlich nach dem modifizierten Verfahren 28 g Mannoheptulose gewonnen.

Der kompetitive Glucokinaseinhibitor Mannoheptulose ist wie Glucose in der Lage, am aktiven Zentrum des Enzyms zu binden. Die Mannoheptulose stabilisiert somit die geschlossene aktive Form der Glucokinase (Zelent *et al.* 2005; Baltrusch & Lenzen 2007) und verhindert die Bindung und Phosphorylierung des Substrats Glucose. In einem photometrischen enzymgekoppelten Assay konnte der Einfluss spezifischer Hemmstoffe auf die Aktivität rekombinant hergestellter humaner Glucokinase ermittelt werden (Lenzen *et al.* 1987; Tiedge *et al.* 2000). Kommerziell erhältliche synthetisierte Mannoheptulose mit 100%iger Reinheit führte bei einer Konzentration von 25 mmol/l zu einer spezifischen kompetitiven Hemmung der Glucokinaseaktivität um 65%. Der gewonnene flüssige Mannoheptuloseextrakt, wie auch der gefriergetrocknete kristalline Reinstoff, hemmte die Aktivität der Glucokinase bei einer Mannoheptulosekonzentration von 25 mmol/l vergleichbar um ca. 57%. Weiterhin konnte erstmals gezeigt werden, dass auch der als Nebenprodukt aus der Avocado isolierte Zuckeralkohol Perseitol die Glucokinaseaktivität hemmt. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Hemmung durch Perseitol bedürfen weiterer Aufklärung. Die extrahierte Mannoheptulose hemmte die Glucokinase signifikant,

allerdings zeigten die Messergebnisse auch nach mehrfacher Durchführung des photometrischen enzymgekoppelten Tests zur Bestimmung der Glucokinaseenzymaktivität eine hohe Standardabweichung. Diese Ungenauigkeiten sind wahrscheinlich auf Rückstände des Lösungsmittels Ethanol und der Glucose in der extrahierten Mannoheptulose zurückzuführen. Ethanol ist enzymtoxisch, da es Konformationsänderungen im Protein hervorruft. Glucoserückstände im Extrakt würden die bei der Messung eingesetzte Glucosekonzentration verfälschen. Auch ist es durch die nicht vollständig kristalline Struktur und der daraus resultierenden Inhomogenität problematisch, die extrahierte Mannoheptulose in einer definierten Konzentration im Assay einzusetzen. Die leicht bräunliche Färbung der extrahierten Mannoheptulose kann zusätzlich die photometrische Detektion im Assay stören und somit zu abweichenden Ergebnissen führen. Daher wurden die extrahierten Inhibitoren trotz ihrer hohen Reinheit in weiterführenden Experimenten nicht verwendet, sondern chemisch synthetisierte Substanzen eingesetzt.

3.2 Untersuchungen zur Hemmung der Glucokinaseaktivität durch Mannoheptulose, Perseitol und Sedoheptulose

Es sollte nachfolgend insbesondere der Effekt des Zuckeralkohols Perseitol und der Heptulose Sedoheptulose im Vergleich zum bekannten Inhibitor Mannoheptulose auf die Glucokinaseenzymaktivität untersucht werden. Wie erwartet führte die synthetisierte Mannoheptulose zu einer Hemmung der Glucokinaseenzymaktivität. Mit dem synthetisierten Perseitol konnte der Effekt des extrahierten Perseitols bestätigt werden und Perseitol somit als neuer Inhibitor der Glucokinase identifiziert werden. Auch das Enantiomer der Mannoheptulose, die Sedoheptulose, wurde als potentieller Inhibitor der Glucokinase in Betracht gezogen. Durch die synthetisierte Sedoheptulose konnte allerdings keine Hemmung der Enzymaktivität der Glucokinase erreicht werden. Die räumliche Anordnung der Hydroxylgruppen an den Chiralitätszentren, wie sie in der Mannoheptulose und dem korrespondierenden Zuckeralkohol Perseitol gleichermaßen vorliegt (Kanters *et al.* 1990), scheint diesen Substanzen eine Bindung an das Enzym Glucokinase zu ermöglichen und somit zur Hemmung zu führen. Die Sedoheptulose, die nicht in der Lage war, die Glucokinase zu hemmen, ist ein Enantiomer der Mannoheptulose und unterscheidet sich bezüglich der Position der Hydroxylgruppe am vierten C-Atom. Dieser Hydroxylgruppe scheint daher eine besondere Rolle in der Glucokinasebindung der Heptulosen zuzukommen. Die Glucokinasehemmung durch Perseitol ist durch eine Erhöhung des $S_{0,5}$ -Werts gekennzeichnet. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich wie bei Mannoheptulose um einen kompetitiven Inhibitor handelt.

Die Motilität und die Diffusion der Glucokinase im Zytoplasma der Beta-Zellen konnte durch fluoreszenzmikroskopische Techniken in lebenden insulinsezernierenden MIN6-Zellen analysiert werden (Baltrusch & Lenzen 2007). Dabei wurde eine verminderte zytoplasmatische Motilität der Glucokinase bei einer niedrigen Glucosekonzentration festgestellt, die nicht nur durch Zugabe von Glucose sondern auch durch Zugabe des Inhibitors Mannoheptulose wieder erhöht werden konnte. Diese Ergebnisse weisen auf eine Beeinflussung der Regulation der Glucokinase-Motilität durch die glucoseinduzierte Konformationsänderung des Enzyms hin. Zudem stärken sie die Annahme, dass der kompetitive Inhibitor Mannoheptulose wie die Glucose in der Lage ist, die geschlossene Form des Glucokinaseproteins zu stabilisieren (Zelent *et al.* 2005). Diese Hypothese sollte durch den Einsatz des neu entdeckten Inhibitors Perseitol weiter bestätigt werden. Eine Inkubation von insulinproduzierenden Zellen mit Perseitol bewirkte allerdings im Gegensatz zur Mannoheptulose keine Hemmung der Glucokinaseenzymaktivität. Damit scheint der Zuckeralkohol Perseitol im Gegensatz zur Mannoheptulose in intakten Beta-Zellen nicht intrazellulär aufgenommen zu werden. Das Vorkommen und die Funktion der zellulären Glucosetransporter, die für die Aufnahme von Glucose und weiterer Zucker in die Zelle verantwortlich sind, ist streng gewebs- und substratspezifisch (Thorens 2004). In den Beta-Zellen liegt der GLUT2 Glucosetransporter und mit geringerer Expression auch der GLUT1 Glucosetransporter vor. Während der Zucker Mannoheptulose durch diese Transporter in die Zelle aufgenommen wird, scheint dem Zuckeralkohol Perseitol diese Transportmöglichkeit nicht zur Verfügung zu stehen. Es gibt Hinweise darauf, dass Perseitol nach oraler Gabe im Darm resorbiert wird. So kann spekuliert werden, dass Perseitol intrazellulär über den GLUT5-Transporter aufgenommen wird, der primär dem Fructosetransport im Dünndarm dient. Allerdings zeigen Studien zur Resorption von Zuckeralkoholen deutliche Speziesunterschiede zwischen Ratte und Mensch. Bisher konnte nur für den Hausspatz eine Aufnahme von Perseitol nach Injektion gezeigt werden (Chediack *et al.* 2003).

Es wurde in einer Studie berichtet, dass eine Langzeitinkubation von insulinsezernierenden INS-1-Zellen mit Mannoheptulose einen protektiven Effekt gegenüber einer durch hohe Glucosekonzentrationen hervorgerufenen Abnahme des Insulingehalts und der Glucosefreisetzung hatte (Brock *et al.* 2002). Es wurde dabei eine Mannoheptulosekonzentration eingesetzt, die zu einer halbmaximalen Hemmung der Glucokinase führte. Dieser Befund steht im Gegensatz zu der allgemein akzeptierten Funktion der Glucokinase als Sensorenzym der glucoseinduzierten Insulinsekretion (Lenzen & Panten 1988; Matschinsky

1990) und Studien, die eine Hemmung der Insulinsekretion durch Mannoheptulose zeigen konnten (Lenzen 1992).

3.3 Die Glucokinase und deren Substrat Glucose vermitteln keine Toxizität in Beta-Zellen

Die toxische Wirkung von hohen Glucosekonzentrationen auf insulinproduzierende Beta-Zellen ist zudem nicht allgemein akzeptiert, sondern wird sehr kontrovers diskutiert. So wurde in einer Studie gezeigt, dass eine Inkubation bei hoher Glucose die Vitalität und den Glucosemetabolismus von MIN6N8-Zellen herabsetzt. Es konnte in diesen Zellen eine reduzierte Glucokinaseexpression gezeigt werden (Kim *et al.* 2005), wobei der Mechanismus dieser Regulation aber unklar blieb. Letztlich würde aufgrund dieser Arbeit eine Abnahme der Glucokinaseaktivität für die reduzierte glucoseinduzierte Insulinsekretion ursächlich sein. Im Gegensatz dazu stehen Studien, die für einen toxischen Effekt durch erhöhte Glucosekonzentrationen den dadurch gesteigerten Glucosemetabolismus und daher speziell die Glucokinase mit ihrer Glucosesensorenfunktion verantwortlich machen (Wang & Iynedjian 1997; Faradji *et al.* 2001; Brock *et al.* 2002). Die Inkubation primärer Beta-Zellen der Ratte bei einer erhöhten Glucosekonzentration hatte im Gegensatz dazu einen protektiven Effekt auf die Vitalität der Zellen, da eine gesteigerte Synthese antiapoptotischer Proteine und daher kein Anstieg der Apoptose und Nekrose in der Zellpopulation festgestellt wurde (Hoorens *et al.* 1996).

Im Gegensatz zur Glucotoxizität ist die Tatsache, dass eine Lipotoxizität in Beta-Zellen durch hohe Konzentrationen freier Fettsäuren ausgelöst wird, allgemein akzeptiert und anhand mehrerer Studien belegt (Bollheimer *et al.* 1998; Kelpe *et al.* 2003; Cnop 2008). Ob jedoch eine parallel erhöhte Glucosekonzentration für eine weitere Steigerung der toxischen Wirkung durch freie Fettsäuren verantwortlich ist, konnte bisher letztlich nicht geklärt werden (Cnop *et al.* 2001; Poitout 2008). Auch variiert die eingesetzte Fettsäurekonzentration in den bisher veröffentlichten Studien und ist möglicherweise in den durchgeführten Experimenten um ein Vielfaches zu hoch. Darüber kann jedoch nur spekuliert werden, da bisher keine verlässlichen Informationen über die tatsächliche Konzentration der Fettsäuren in der direkten Umgebung der Beta-Zellen im lebenden Organismus zur Verfügung stehen (Poitout 2008).

Daher war es das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss hoher Glucosekonzentrationen auf Beta-Zellen mit einem speziellen Fokus auf das Glucosesensorenzym Glucokinase weiterführend zu untersuchen. Für diese Untersuchungen wurde ein neues Zellmodell etabliert. Dabei erwies sich das RheoSwitch Expressionssystem (Palli *et al.* 2003) im Gegensatz zum seit langem

etablierten Tetracyclin-abhängigen System (Gossen & Bujard 1992), bei dem die Genexpression durch die Zugabe des Antibiotikums Doxycyclin reguliert wird, als überlegen. Insbesondere wurde beim Tetracyclin-abhängigen System eine relativ hohe Expression der Glucokinase ohne Doxycyclin-Zugabe gemessen, die zunächst auf Antibiotikarückstände im fetalen Kälberserum (FCS), das dem Zellkulturmedium zugesetzt wird, zurückgeführt wurde. Durch den Einsatz von doxycyclinfreiem FCS aus französischer Herstellung konnte die Basalexpression zwar herabgesetzt, diese Hintergrundexpression jedoch nicht komplett ausgeschaltet werden. Mittlerweile wurde ein optimiertes Tetracyclin-abhängiges System mit einer veränderten Promotorposition im Vektor entwickelt, welches aber zur Zeit der Etablierung des Zellmodells nicht zur Verfügung stand. Das RheoSwitch-System wurde daher erfolgreich eingesetzt, um eine stabile insulinproduzierende RINm5F-Zelllinie mit präzise regulierbarer Expression der Glucokinase (RINm5F-R-GK) oder des Fusionsproteins EYFP-Glucokinase (RINm5F-R-EYFP-GK) zu generieren. Der Zusatz des synthetischen Induktors RSL1 erlaubt in diesen Zelllinien eine präzise konzentrationsabhängige Regulation der Glucokinaseexpression. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Fusion der Glucokinase mit einem Fluoreszenzprotein zu keiner Einschränkung ihrer Aktivität führt (Baltrusch & Lenzen 2007). Da die Glucokinaseexpression durch diese Markierung schnell und effizient in der lebenden Zelle detektiert werden konnte, wurden die weiterführenden Experimente mit den RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen durchgeführt. Es konnte dabei eindeutig gezeigt werden, dass der Anstieg der EYFP-Fluoreszenz mit dem Anstieg des Glucokinaseproteins und der Glucokinaseexpression in den Zellen korrelierte.

Insbesondere konnte nachgewiesen werden, dass in diesen Zellen mit ansteigender Glucokinaseaktivität auch die glucoseinduzierte Insulinsekretion gesteigert war. Eine Inkubation der RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen mit hoher oder niedriger Glucose veränderte diese Befunde nicht. Es konnte keine Reduktion der Zellvitalität ermittelt werden, auch nicht bei maximaler Glucokinaseexpression. Um eine chronisch hohe Belastung der Zellen durch erhöhte Blutglucosekonzentrationen nachzuempfinden, wie sie beim Typ 2 Diabetes mellitus vorkommen, wurden die RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen für 14 Tage einer erhöhten Glucosekonzentration von 30 mmol/l ausgesetzt. Auch durch diese Verlängerung der Inkubationszeit auf zwei Wochen bei hoher Glucosekonzentration im Zellkulturmedium wurde die Vitalität der RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen nicht beeinflusst. Dagegen wurde die Zellvitalität durch die freie Fettsäure Palmitinsäure signifikant reduziert. Dieser Effekt war allerdings unabhängig von der eingesetzten Glucosekonzentration und der Stärke der Glucokinaseexpression.

RINm5F-Zellen besitzen eine im Vergleich zu primären Beta-Zellen geringere Glucokinaseexpression. Die in diesen RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen durch Induktion hervorgerufene moderate Steigerung der Glucokinaseexpression liegt dann im Bereich der physiologischen Konzentration in primären Zellen. Daher stellen die RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen mit regulierbarer präziser Expression der Glucokinase ein geeignetes Modell dar, um den Einfluss der Glucose sowie der Glucokinase auf den Glucosemetabolismus von Beta-Zellen zu analysieren. Durch diese moderate Glucokinaseexpression besteht nicht die Gefahr, dass ein unphysiologischer Proteingehalt in den Zellen erzeugt wird. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen stehen Beobachtungen, dass eine Überexpression der Glucokinase in Kombination mit hoher Glucose in INS-1- und RIN1046-38-Zellen zu einem gesteigerten Glucosemetabolismus führt, der oxidativen Stress und letztlich eine Apoptose der Zellen auslöst (Wang & Iyendjian 1997; Wu *et al.* 2004). Hierbei wurde allerdings die Glucokinaseexpression durch adenoviralen Gentransfer extrem angehoben. Diese unphysiologische Steigerung der Proteinbiosynthese könnte damit unabhängig von den spezifischen Eigenschaften des exprimierten Proteins für die eingeschränkte Vitalität der Zellen verantwortlich sein.

Die umstrittene Hypothese, dass die Glucokinase eine zelltoxische Wirkung auf insulinproduzierende Zellen vermittelt, konnte durch die Experimente mit präzise regulierbarer Glucokinaseexpression im physiologischen Bereich nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte durch eine erhöhte Glucokinaseexpression die glucoseinduzierte Insulinsekretion nachweislich gesteigert werden. Diese Erkenntnis spricht für die Weiterentwicklung und therapeutische Anwendung von chemischen Glucokinase-Aktivatoren zur Normalisierung einer krankheitsbedingt erhöhten Blutglucosekonzentration, denn sie hat eine positive Wirkung auf die insulinsekretorische Funktion. Bei der Beurteilung der bisher veröffentlichten Studien zur Glucotoxizität muss der Unterschied zwischen Zellkulturexperimenten mit Beta-Zellen und Untersuchungen im Gesamtorganismus berücksichtigt werden. Chronisch erhöhte Blutglucosespiegel können *in vivo* in den einzelnen Organen ganz unterschiedliche Reaktionen bewirken und sich über Stoffwechselmediatoren zudem auch gegenseitig stark beeinflussen (Poitout 2008).

3.4 Der Einfluss der Glucokinase auf die Kopplung der Glykolyse an den mitochondrialen Stoffwechsel in Beta-Zellen

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des mitochondrialen Stoffwechsels in Abhängigkeit von der Glucokinaseexpression. Mitochondrien übernehmen eine wichtige Funktion im Energiehaushalt, da sie für den wesentlichen Anteil der intrazellulären ATP-Produktion verantwortlich sind. Für die Beta-Zellen ist diese Funktion der Mitochondrien daher von besonderer Bedeutung, da sie im K_{ATP} -abhängigen Weg der glucoseinduzierten Insulinsekretion ein wesentliches Kopplungselement darstellen. Während die Messung des mitochondrialen Membranpotentials selbst den aktuellen Energie- und Redoxstatus eines Mitochondriums widerspiegelt, macht die Betrachtung des Anstiegs des mitochondrialen Membranpotentials nach einem Glucosestimulus die Verfügbarkeit von Substraten für Citratzyklus und Atmungskette im Mitochondrium aus der Glykolyse erkennbar. Deshalb wurde in RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen der durch einen Glucosestimulus ausgelöste Anstieg des mitochondrialen Membranpotentials fluoreszenzmikroskopisch mittels des potentiometrischen Farbstoffs TMRE analysiert. Die Kombination mit dem stabilen MitoTracker Green Farbstoff ermöglichte die quantitative Auswertung.

RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen, die für 48 h bei erhöhten Glucosekonzentrationen oder mit gesteigerter Glucokinaseexpression inkubiert wurden, wiesen nach einer 90-minütigen Hungerperiode einen schnelleren glucoseinduzierten Anstieg des mitochondrialen Membranpotentials auf als die Zellen, die bei einer Standard-Glucosekonzentration und ohne Glucokinaseüberexpression inkubiert wurden. Eine Kombination aus einer gesteigerten Glucosekonzentration und Glucokinaseexpression hatte eine weitere Beschleunigung des glucoseinduzierten Anstiegs des mitochondrialen Membranpotentials zur Folge. Die Verstärkung der mitochondrialen Antwort auf einen Glucosestimulus nach einer 48-stündigen Vorinkubation bei hoher Glucose konnte an primären Beta-Zellen der Ratte bestätigt werden. Diese Ergebnisse belegen, dass auch bei hohem Glucoseumsatz der Glucosemetabolismus direkt an den mitochondrialen Stoffwechsel gekoppelt ist. Eine effektive Verknüpfung des mitochondrialen Stoffwechsels an den Glucosemetabolismus in primären Beta-Zellen und Beta-Zelllinien ist auch in anderen Studien beschrieben worden (Heart *et al.* 2006; Spacek *et al.* 2008) und wird als wesentlich für eine bedarfsgerechte Insulinsekretion angesehen (Malmgren *et al.* 2009).

Das mitochondriale Membranpotential war in RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen nach einer 90-minütigen Hungerperiode in Bezug auf die einzelnen Mitochondrien deutlich heterogen. Dies deutet auf einen unterschiedlichen Energiestatus und möglicherweise unterschiedliche

Funktionen einzelner Mitochondrien innerhalb einer Zelle hin. Durch eine Vorinkubation bei erhöhter Glucose, jedoch nicht durch eine gesteigerte Glucokinaseexpression, wurde diese Heterogenität signifikant reduziert. Es ist wichtig anzumerken, dass das durchschnittliche mitochondriale Membranpotential der Zellen unabhängig von der während der 48-stündigen Vorinkubation eingesetzten Glucosekonzentration gleich war. Es lässt sich daher vermuten, dass es zu einer direkten Adaption der Mitochondrien innerhalb einer Zelle an die hohe Glucosekonzentration kommt. Um den in den RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen beobachteten schnellen Anstieg des mitochondrialen Membranpotentials zu gewährleisten, scheint ein höherer Organisationsgrad des mitochondrialen Netzwerkes nötig zu sein. Die Hypothese liegt nahe, dass sich bei niedriger Glucose möglicherweise einige Mitochondrien in einem Ruhezustand befinden und daher ein deutlich erniedrigtes mitochondriales Membranpotential haben. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien, die eine variable, durch eine hohe Glucosekonzentration veränderbare Reaktivität der Mitochondrien innerhalb einer Beta-Zelle belegen (Heart *et al.* 2006; Wikstrom *et al.* 2007).

3.5 Die Morphologie der Mitochondrien in Beta-Zellen

Damit kommt der Betrachtung der Morphologie der Mitochondrien eine besondere Bedeutung zu. Mitochondrien zeigen ein hochdynamisches Verhalten, das durch häufige Verschmelzungen (Fusion) und Teilungen (Fission) der Mitochondrien gekennzeichnet ist. Die Morphologie und Anordnung der Mitochondrien in der Zelle legt wahrscheinlich die biochemische Funktion der einzelnen Mitochondrien fest und ermöglicht den Mitochondrien Subpopulationen innerhalb des mitochondrialen Netzwerkes zu bilden. Daher kommt den Interaktionen mit anderen intrazellulären Strukturen wie dem ER oder dem Cytoskelett eine funktionsabhängige regulatorische Funktion zu (Kuznetsov & Margreiter 2009; Willems *et al.* 2009). Dabei wurde festgestellt, dass vor allem die Mitochondrien in Herz- und Skelettmuskelzellen eine eher kugelige, kleine Form annehmen und nicht die Fähigkeit besitzen sich frei zu bewegen und durch Fusion- und Fission-Ereignisse ein dynamisches Netzwerk zu bilden. Es besteht auch eine direkte Abhängigkeit der spezifischen zellulären Funktion der Mitochondrien von der fest verankerten Lokalisation innerhalb der Zelle. In Muskelzellen ist diese Abhängigkeit eindeutig, so dass anhand der zellulären in diesen Zelltypen fixierten Lokalisation drei mitochondriale Subpopulationen mit unterschiedlichem Schwerpunkt in ihrer metabolischen Aktivität unterschieden werden konnten (Kuznetsov *et al.* 2004; Kuznetsov *et al.* 2009). Die meisten vorliegenden Untersuchungen zur mitochondrialen Morphologie sind an Muskelzellen und Fibroblasten durchgeführt worden.

An Beta-Zellen wurden bisher nur sehr wenige Studien durchgeführt. Die RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen erwiesen sich als geeignet, um die Morphologie und Funktionalität der Mitochondrien unter dem Einfluss von hoher Glucose und einer gesteigerten Glucokinase-expression in Beta-Zellen zu charakterisieren. Durch den Einsatz des photokonvertierbaren Fluoreszenzfarbstoffs Dendra2 in Kopplung an die Cytochrom-c-Oxidase konnten alle Mitochondrien der Zelle durch grüne Fluoreszenz markiert werden. Durch die Technik der Photokonvertierung eines einzelnen Mitochondriums konnte die Bewegung dieses nun rot fluoreszierenden Mitochondriums und die Interaktion mit den anderen grün fluoreszierenden Mitochondrien detailliert beobachtet werden.

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass die Mitochondrien in RINm5F-Zellen einer stark ausgeprägten Dynamik unterliegen. Daher stellte sich die Morphologie sehr variabel dar und reichte von kleinen kugelartigen Mitochondrien bis hin zu länglichen dünnen Strukturen. Die Morphologie und Dynamik der Beta-Zellen wurde durch eine Expression der Glucokinase in RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen nicht verändert. Nach einer 48-stündigen Inkubation in Anwesenheit einer hohen Glucosekonzentration wurden ebenfalls Fusionsprozesse detektiert, die zur Ausbildung eines komplexen Netzwerks führten. Unabhängig von der Glucosekonzentration fanden in den RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen auch mehrere Teilungen nacheinander statt. Jedoch führten diese Teilungen nicht zu einem komplett fragmentierten mitochondrialen Netzwerk, da durch folgende Fusionen die Struktur aufrechterhalten werden konnte. Es wurde kürzlich auch in Beta-Zellen gezeigt, dass durch abwechselnde Trennungen und selektive Verschmelzungen der Mitochondrien eine Art Kontrollmechanismus stattfindet, durch den dysfunktionale Mitochondrien durch Autophagie aus der Zelle eliminiert werden können (Twig *et al.* 2008a; Twig *et al.* 2008b; Mouli *et al.* 2009). Eine komplette Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks ist auch ein erstes Anzeichen für eine Apoptose der Zellen, das noch vor den bekannten mit der Apoptose verknüpften Mechanismen wie einer Cytochrom-c-Freisetzung oder einer Aktivierung der Kaspasen erkennbar ist. Ein Gleichgewicht von Verschmelzung und Teilung der Mitochondrien scheint daher für ein funktionelles mitochondriales Netzwerk in Beta-Zellen essentiell. Dies legt die Hypothese einer gestörten mitochondrialen Dynamik als Beitrag zur Beta-Zell Dysfunktion beim Typ 2 Diabetes mellitus nahe und stellt einen interessanten Ansatzpunkt für weiterführende Experimente dar.

4 Zusammenfassung

Die Erhöhung der Blutglucosekonzentration nach Nahrungsaufnahme führt zu einer Insulinfreisetzung aus den insulinproduzierenden Beta-Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Dieser Regelmechanismus ist von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Blutglucosehomöostase. Störungen in der glucoseinduzierten Insulinsekretion führen zur Erkrankung des Typ 2 Diabetes mellitus. Das glucosephosphorylierende Enzym Glucokinase besitzt im Gegensatz zu den Hexokinasen eine niedrigere Affinität gegenüber dem Substrat Glucose und kann daher die Funktion eines Glucosesensors in den Beta-Zellen des Pankreas übernehmen. Durch Bindung des Substrats Glucose kommt es zu einer deutlichen Konformationsänderung in der Glucokinasestruktur, die die kooperative Reaktionskinetik des Enzyms erklärt. Die Glucokinase wird in den Beta-Zellen endogen durch das bifunktionelle Enzym 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase aktiviert. Die Assoziation zwischen beiden Enzymen erfolgt bevorzugt nach einem Anstieg der Glucosekonzentration und führt zu einer Steigerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion. Das Konzept einer therapeutischen Aktivierung der Glucokinase führte zur Entwicklung von chemischen Glucokinase-Aktivatoren. Diese sind ebenfalls in der Lage, die glucoseinduzierte Insulinsekretion zu steigern. Allerdings setzen sie im Gegensatz zur 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase die Affinität der Glucokinase zum Substrat Glucose herab und können daher auch eine Hypoglykämie hervorrufen. Ein endogener Inhibitor der Glucokinase konnte in den Beta-Zellen bislang nicht identifiziert werden. Die Heptulose Mannoheptulose ist ein bekannter kompetitiver Inhibitor der Glucokinase, die in der Lage ist, die glucoseinduzierte Insulinsekretion herabzusetzen. Während Sedoheptulose die Glucokinase nicht hemmt, konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der Zuckeralkohol der Mannoheptulose, das Perseitol, ebenfalls ein kompetitiver Inhibitor der Glucokinase darstellt.

Im fortschreitenden Verlauf des Typ 2 Diabetes mellitus kommt es zu einer chronisch erhöhten Blutglucosekonzentration, die durch das Übergewicht der Patienten zusätzlich mit einem Anstieg an freien Fettsäuren im Plasma einhergeht. Daher wird diskutiert, ob durch chronisch erhöhte freie Fettsäuren und/oder durch Glucose die Beta-Zellfunktion beeinträchtigt wird oder sogar der Zelltod ausgelöst wird. Da die Glucokinase das Schlüsselenzym des Glucosemetabolismus in den Beta-Zellen ist, wurde sie als Mediator einer möglichen Glucotoxizität oder Glucolipotoxizität postuliert. Daher war es das Ziel

dieser Arbeit, diese Hypothese, die mit der Funktion der Glucokinase als Sensor der glucosestimulierten Insulinsekretion kaum vereinbar erscheint, zu überprüfen.

Hierzu wurde das RheoSwitch-System in insulinproduzierenden RINm5F-Zellen etabliert, welches durch den Zusatz des synthetischen Induktors RSL1 eine präzise regulierte Expression eines Zielgens erlaubt. Durch Fusion des Fluoreszenzproteins EYFP an die Glucokinase konnte in den generierten RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen der durch RSL1 induzierte Anstieg der Glucokinaseexpression direkt fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Dieser korrelierte interessanterweise nicht nur mit der Glucokinase Enzymaktivität, sondern auch mit einem Anstieg der glucoseinduzierten Insulinsekretion. Palmitinsäure führte zu einem signifikanten Vitalitätsverlust der RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Studien überein und bestätigt die Existenz einer Lipotoxizität, deren zugrunde liegender Mechanismus Gegenstand der Forschung ist. Dabei wird dem ER-Stress sowie der gesteigerten Produktion von freien Sauerstoffradikalen eine Rolle zugeschrieben. In Form einer Glucolipotoxizität wurde eine verstärkte Bildung von freien Sauerstoffradikalen durch den hohen mitochondrialen Substratumsatz diskutiert. Dies konnte in den durchgeführten Studien nicht bestätigt werden. Weder potenzierte hohe Glucose die toxische Wirkung der freien Fettsäuren, noch reduzierte sie alleine die Zellvitalität im 48h-Experiment. Auch nach Langzeitinkubation für 14 Tage bei hoher Glucose war die Vitalität der RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen nicht beeinträchtigt. Eine Erhöhung der Glucokinaseexpression blieb in allen Versuchen nachweislich ohne Einfluss auf die Zellvitalität. Die Hypothese, dass die Glucokinase einen zelltoxischen Einfluss in Beta-Zellen vermittelt, konnte somit nicht bestätigt werden. Das Konzept, dass die erhöhte Glucokinaseexpression zu einer Steigerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion führt, wurde hingegen bestätigt und durch Analyse des mitochondrialen Stoffwechsels weiterführend untersucht.

Dazu wurde nicht nur das mitochondriale Membranpotential selbst, sondern auch der durch einen Glucosestimulus ausgelöste Anstieg des mitochondrialen Membranpotentials fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen wiesen nach einer Hungerperiode von 90 Minuten einen schnelleren glucoseinduzierten Anstieg des mitochondrialen Membranpotentials auf, wenn sie zuvor für 48 h bei hoher Glucose inkubiert wurden. Dies bedeutet eine effektive Kopplung des zytoplasmatischen Glucosemetabolismus an den mitochondrialen Stoffwechsel. Durch Erhöhung der Glucokinaseexpression wurde diese metabolische Koordination weiter verbessert. Diese an RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen gewonnenen wesentlichen Ergebnisse konnten an primären Beta-Zellen der Ratte bestätigt werden. Interessanterweise war das mitochondriale Membranpotential unabhängig von der

Vorinkubation nach der 90-minütigen Hungerperiode in den RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen gleich. Allerdings konnte eine deutliche Heterogenität im mitochondrialen Membranpotential zwischen den einzelnen Mitochondrien festgestellt werden. Diese nahm durch Vorinkubation bei hoher Glucose signifikant ab. Somit konnte im Zellmodell kein Funktionsverlust der Mitochondrien identifiziert werden. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass eine hohe Glucosekonzentration in vivo in anderen Organen, insbesondere im Fettgewebe, zur gesteigerten Freisetzung von Signalproteinen oder Stoffwechselzwischenprodukten führt, welche alleine oder zusammen mit der hohen Glucose einen zelltoxischen Einfluss auf die Beta-Zellen haben. Dies muss an Tiermodellen des Typ 2 Diabetes mellitus geklärt werden.

Dagegen stellen die RINm5F-R-EYFP-GK Zellen ein geeignetes Modell dar, um die Morphologie und Funktionalität der Mitochondrien unter dem Einfluss von hoher Glucose weiter zu untersuchen. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass das mitochondriale Netzwerk durch Fission und Fusion dynamisch reguliert wird. Durch die Trennung und selektive Verschmelzung der Mitochondrien können Mitochondrien mit Dysfunktion aussortiert und durch Autophagie eliminiert werden. Durch die fluoreszenzmikroskopische Technik der Photokonvertierung konnte der Verlauf eines einzelnen Dendra2-markierten Mitochondriums in RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen charakterisiert werden. In RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen konnte mit dieser Methode eine Frequenz von Fission- und Fusion-Ereignissen detektiert werden, wie sie bereits für vitale Zellen in der Literatur beschrieben wurde. Die Glucokinaseexpression hatte keinen Einfluss auf die Dynamik des mitochondrialen Netzwerks. Der Nachweis von aufeinander folgenden Fission-Ereignissen und die damit einhergehende gesteigerte Fragmentierung der Mitochondrien konnte in RINm5F-R-EYFP-GK-Zellen sowohl nach Vorinkubation bei hoher als auch bei niedriger Glucose festgestellt werden. Für insulinproduzierende INS-1-Zellen wurde bereits beschrieben, dass es eine solche mitochondriale Subpopulation gibt, die keine Fusionen eingeht. Dies scheint damit auch für RINm5F-Zellen zuzutreffen.

Die durchgeführten Studien unterstreichen damit die zentrale Rolle der Glucokinase als Glucosesensorenzym der glucoseinduzierten Insulinsekretion. Es konnte gezeigt werden, dass die Glucokinase die Kopplung zwischen Glykolyse und mitochondrialem Stoffwechsel in Beta-Zellen wesentlich fördert. Im Zellmodell konnte eine durch den Glucosemetabolismus vermittelte Glucotoxizität in Beta-Zellen ausgeschlossen werden und scheint im Gegensatz zur Lipotoxizität kein wesentlicher Faktor bei der Entstehung des Typ 2 Diabetes mellitus zu sein.

5 Literaturverzeichnis

- Baltrusch, S., Francini, F., Lenzen, S. & Tiedge, M. (2005).** Interaction of glucokinase with the liver regulatory protein is conferred by leucine-asparagine motifs of the enzyme. *Diabetes* **54**: 2829-2837.
- Baltrusch, S., Langer, S., Massa, L., Tiedge, M. & Lenzen, S. (2006).** Improved metabolic stimulus for glucose-induced insulin secretion through GK and PFK-2/FBPase-2 coexpression in insulin-producing RINm5F cells. *Endocrinology* **147**: 5768-5776.
- Baltrusch, S. & Lenzen, S. (2007).** Novel insights into the regulation of the bound and diffusible glucokinase in MIN6 beta-cells. *Diabetes* **56**: 1305-1315.
- Baltrusch, S. & Lenzen, S. (2008).** Monitoring of glucose-regulated single insulin secretory granule movement by selective photoactivation. *Diabetologia* **51**: 989-996.
- Baltrusch, S., Lenzen, S., Okar, D. A., Lange, A. J. & Tiedge, M. (2001).** Characterization of glucokinase-binding protein epitopes by a phage-displayed peptide library. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel interaction partner. *The Journal of biological chemistry* **276**: 43915-43923.
- Blatherwick, N. R., Hardy, W. L. & Sawyer, S. D. (1940).** METABOLISM OF d-MANNOHEPTULOSE. EXCRETION OF THE SUGAR AFTER EATING AVOCADO. *J Biol Chem* **133**: 643-650.
- Bollheimer, L. C., Skelly, R. H., Chester, M. W., McGarry, J. D. & Rhodes, C. J. (1998).** Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. *The Journal of clinical investigation* **101**: 1094-1101.
- Brock, B., Mogensen, J. H., Gregersen, S. & Hermansen, K. (2002).** Glucose desensitization in INS-1 cells: evidence of impaired function caused by glucose metabolite(s) rather than by the glucose molecule per se. *Metabolism: clinical and experimental* **51**: 671-677.
- Brocklehurst, K. J., Payne, V. A., Davies, R. A., Carroll, D., Vertigan, H. L., Wightman, H. J., Aiston, S., Waddell, I. D., Leighton, B., Coghlan, M. P. & Agius, L. (2004).** Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators. *Diabetes* **53**: 535-541.
- Bruce, J. I., Giovannucci, D. R., Blinder, G., Shuttleworth, T. J. & Yule, D. I. (2004).** Modulation of $[Ca^{2+}]_i$ signaling dynamics and metabolism by perinuclear mitochondria in mouse parotid acinar cells. *The Journal of biological chemistry* **279**: 12909-12917.
- Cardenas, M. L. (1997).** Kinetic behaviour of vertebrate hexokinases with emphasis on hexokinase D (IV). *Biochemical Society transactions* **25**: 131-135.
- Chediack, J. G., Caviedes-Vidal, E., Fasulo, V., Yamin, L. J. & Karasov, W. H. (2003).** Intestinal passive absorption of water-soluble compounds by sparrows: effect of molecular size and luminal nutrients. *J Comp Physiol B* **173**: 187-197.
- Chen, H. & Chan, D. C. (2004).** Mitochondrial dynamics in mammals. *Current topics in developmental biology* **59**: 119-144.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E. & Chan, D. C. (2003).** Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology* **160**: 189-200.
- Chudakov, D. M., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. (2007a).** Tracking intracellular protein movements using photoswitchable fluorescent proteins PS-CFP2 and Dendra2. *Nature protocols* **2**: 2024-2032.

- Chudakov, D. M., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. (2007b).** Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement. *BioTechniques* **42**: 553, 555, 557 passim.
- Cnop, M. (2008).** Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochemical Society transactions* **36**: 348-352.
- Cnop, M., Hannaert, J. C., Gruppig, A. Y. & Pipeleers, D. G. (2002).** Low density lipoprotein can cause death of islet beta-cells by its cellular uptake and oxidative modification. *Endocrinology* **143**: 3449-3453.
- Cnop, M., Hannaert, J. C., Hoorens, A., Eizirik, D. L. & Pipeleers, D. G. (2001).** Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* **50**: 1771-1777.
- Cockburn, B. N., Ostrega, D. M., Sturis, J., Kubstrup, C., Polonsky, K. S. & Bell, G. I. (1997).** Changes in pancreatic islet glucokinase and hexokinase activities with increasing age, obesity, and the onset of diabetes. *Diabetes* **46**: 1434-1439.
- Cornish-Bowden, A. & Storer, A. C. (1986).** Mechanistic origin of the sigmoidal rate behaviour of rat liver hexokinase D ('glucokinase'). *The Biochemical journal* **240**: 293-296.
- De Giorgi, F., Lartigue, L. & Ichas, F. (2000).** Electrical coupling and plasticity of the mitochondrial network. *Cell calcium* **28**: 365-370.
- Duchen, M. R. (2004).** Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Molecular aspects of medicine* **25**: 365-451.
- Efanov, A. M., Barrett, D. G., Brenner, M. B., Briggs, S. L., Delaunoy, A., Durbin, J. D., Giese, U., Guo, H., Radloff, M., Gil, G. S., Sewing, S., Wang, Y., Weichert, A., Zaliani, A. & Gromada, J. (2005).** A novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function. *Endocrinology* **146**: 3696-3701.
- Faradji, R. N., Havari, E., Chen, Q., Gray, J., Tornheim, K., Corkey, B. E., Mulligan, R. C. & Lipes, M. A. (2001).** Glucose-induced toxicity in insulin-producing pituitary cells that coexpress GLUT2 and glucokinase. Implications for metabolic engineering. *The Journal of biological chemistry* **276**: 36695-36702.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1992).** Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 5547-5551.
- Grimsby, J., Sarabu, R., Corbett, W. L., Haynes, N. E., Bizzarro, F. T., Coffey, J. W., Guertin, K. R., Hilliard, D. W., Kester, R. F., Mahaney, P. E., Marcus, L., Qi, L., Spence, C. L., Teng, J., Magnuson, M. A., Chu, C. A., Dvorozniak, M. T., Matschinsky, F. M. & Grippo, J. F. (2003).** Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. *Science (New York, NY)* **301**: 370-373.
- Guertin, K. R. & Grimsby, J. (2006).** Small molecule glucokinase activators as glucose lowering agents: a new paradigm for diabetes therapy. *Current medicinal chemistry* **13**: 1839-1843.
- Gurskaya, N. G., Verkhusha, V. V., Shcheglov, A. S., Staroverov, D. B., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. (2006).** Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nature biotechnology* **24**: 461-465.
- Heart, E., Corkey, R. F., Wikstrom, J. D., Shirihai, O. S. & Corkey, B. E. (2006).** Glucose-dependent increase in mitochondrial membrane potential, but not cytoplasmic calcium, correlates with insulin secretion in single islet cells. *American journal of physiology* **290**: E143-E148.
- 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. *The Journal of clinical investigation* **98**: 1568-1574.

- Kamata, K., Mitsuya, M., Nishimura, T., Eiki, J. & Nagata, Y. (2004).** Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. *Structure* **12**: 429-438.
- Kanters, J. A., Schouten, A. & van Bommel, M. (1990).** Structure of lactitol (4-O-beta-D-galactopyranosyl-D-glucitol) monohydrate: and artificial sweetener. *Acta Crystallogr C* **46 (Pt 12)**: 2408-2411.
- Kappler-Tanudyaya, N., Schmitt, H., Tippkotter, N., Meyer, L., Lenzen, S. & Ulber, R. (2007).** Combination of biotransformation and chromatography for the isolation and purification of mannoheptulose. *Biotechnology journal* **2**: 692-699.
- Kelpe, C. L., Moore, P. C., Parazzoli, S. D., Wicksteed, B., Rhodes, C. J. & Poitout, V. (2003).** Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *The Journal of biological chemistry* **278**: 30015-30021.
- Kerner, W. & Brückel, J. (2009).** Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie und Stoffwechsel Supplement 2 Praxis-Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft* 115-117.
- Kim, W. H., Lee, J. W., Suh, Y. H., Hong, S. H., Choi, J. S., Lim, J. H., Song, J. H., Gao, B. & Jung, M. H. (2005).** Exposure to chronic high glucose induces beta-cell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **54**: 2602-2611.
- Koottiwut, S., Kebede, M., Zraika, S., Visinoni, S., Aston-Mourney, K., Favaloro, J., Tikellis, C., Thomas, M. C., Forbes, J. M., Cooper, M. E., Dunlop, M., Proietto, J. & Andrikopoulos, S. (2005).** High glucose-induced impairment in insulin secretion is associated with reduction in islet glucokinase in a mouse model of susceptibility to islet dysfunction. *Journal of molecular endocrinology* **35**: 39-48.
- Kuznetsov, A. V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P. & Margreiter, R. (2009).** The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**: 1928-1939.
- Kuznetsov, A. V. & Margreiter, R. (2009).** Heterogeneity of Mitochondria and Mitochondrial Function within Cells as Another Level of Mitochondrial Complexity. *International journal of molecular sciences* **10**: 1911-1929.
- Kuznetsov, A. V., Usson, Y., Lerverve, X. & Margreiter, R. (2004).** Subcellular heterogeneity of mitochondrial function and dysfunction: evidence obtained by confocal imaging. *Molecular and cellular biochemistry* **256-257**: 359-365.
- La Forge, F. B. (1917).** D-Mannoketoheptose, a new sugar from the avocado. *J Biol Chem* **28**: 511-522.
- Leighton, B., Atkinson, A. & Coghlan, M. P. (2005).** Small molecule glucokinase activators as novel anti-diabetic agents. *Biochemical Society transactions* **33**: 371-374.
- Lenzen, S. (1992).** Glucokinase: signal recognition enzyme for glucose-induced insulin secretion. In Nutrient regulation of insulin secretion. Flatt, P. R. e., Portland Press, London and Chapel Hill. : 101-125.
- Lenzen, S. & Panten, U. (1988).** Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochemical pharmacology* **37**: 371-378.
- Lenzen, S., Tiedge, M. & Panten, U. (1987).** Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta endocrinologica* **115**: 21-29.
- Liu, X., J., S., L., A. M. & Madore, M. A. (2002).** Postulated Physiological Roles of the Seven-carbon Sugars, Mannoheptulose, and Perseitol in Avocado. *J Amer Soc Hort Sci* **127**: 108 - 114.

- Loew, L. M., Tuft, R. A., Carrington, W. & Fay, F. S. (1993).** Imaging in five dimensions: time-dependent membrane potentials in individual mitochondria. *Biophysical journal* **65**: 2396-2407.
- Loewus F. A., T. W. (1982).** Plant Carbohydrates I: Intracellular Carbohydrates, Springer-Verlag New York, LLC.
- Magnuson, M. A., Andreone, T. L., Printz, R. L., Koch, S. & Granner, D. K. (1989).** Rat glucokinase gene: structure and regulation by insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 4838-4842.
- Magnuson, M. A. & Shelton, K. D. (1989).** An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell. *The Journal of biological chemistry* **264**: 15936-15942.
- Malmgren, S., Nicholls, D. G., Taneera, J., Bacos, K., Koeck, T., Tamaddon, A., Wibom, R., Groop, L., Ling, C., Mulder, H. & Sharoyko, V. V. (2009).** Tight coupling between glucose and mitochondrial metabolism in clonal beta-cells is required for robust insulin secretion. *The Journal of biological chemistry* **284**: 32395-32404.
- Massa, L., Baltrusch, S., Okar, D. A., Lange, A. J., Lenzen, S. & Tiedge, M. (2004).** Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucose phosphorylation and glucose metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes* **53**: 1020-1029.
- Matschinsky, F., Liang, Y., Kesavan, P., Wang, L., Froguel, P., Velho, G., Cohen, D., Permutt, M. A., Tanizawa, Y., Jetton, T. L. & et al. (1993).** Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *The Journal of clinical investigation* **92**: 2092-2098.
- Matschinsky, F. M. (1990).** Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* **39**: 647-652.
- Matschinsky, F. M. (2009).** Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nature reviews* **8**: 399-416.
- Matthaei, S. B., R. Fritsche, A. Gallwitz, B. Häring, H.-U. Joost, H.-G. Kellerer, M. Kloos, C. Kunt, T. Nauck, M. & Schernthaner, G. S., E. Thienel, F. (2009).** Behandlung des Diabetes mellitus Typ2. *Diabetologie und Stoffwechsel Supplement 2 Praxis-Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft* 138-143.
- McBride, H. M., Neuspiel, M. & Wasiak, S. (2006).** Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* **16**: R551-560.
- Middleton, R. J. (1990).** Hexokinases and glucokinases. *Biochemical Society transactions* **18**: 180-183.
- Mouli, P. K., Twig, G. & Shirihai, O. S. (2009).** Frequency and selectivity of mitochondrial fusion are key to its quality maintenance function. *Biophysical journal* **96**: 3509-3518.
- O'Reilly, C. M., Fogarty, K. E., Drummond, R. M., Tuft, R. A. & Walsh, J. V., Jr. (2003).** Quantitative analysis of spontaneous mitochondrial depolarizations. *Biophysical journal* **85**: 3350-3357.
- Olichon, A., Emorine, L. J., Descoins, E., Pelloquin, L., Brichese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C. P., Ducommun, B., Lenaers, G. & Belenguer, P. (2002).** The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS letters* **523**: 171-176.
- Olofsson, C. S., Collins, S., Bengtsson, M., Eliasson, L., Salehi, A., Shimomura, K., Tarasov, A., Holm, C., Ashcroft, F. & Rorsman, P. (2007).** Long-term exposure to glucose and lipids inhibits glucose-induced insulin secretion downstream of granule fusion with plasma membrane. *Diabetes* **56**: 1888-1897.
- Palli, S. R., Kapitskaya, M. Z., Kumar, M. B. & Cress, D. E. (2003).** Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system. *Eur J Biochem* **270**: 1308-1315.

- Patterson, G. H. & Lippincott-Schwartz, J. (2002).** A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science (New York, NY)* **297**: 1873-1877.
- Poitout, V. (2008).** Glucolipotoxicity of the pancreatic beta-cell: myth or reality? *Biochemical Society transactions* **36**: 901-904.
- Printz, R. L. & Granner, D. K. (2005).** Tweaking the glucose sensor: adjusting glucokinase activity with activator compounds. *Endocrinology* **146**: 3693-3695.
- Richtmyer, N. K. (1970).** The Isolation of volemitol and other polyhydric alcohols from avocado seeds. *Carbohydrate research* **12**: 135-138.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A. & Pozzan, T. (1998).** Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science (New York, NY)* **280**: 1763-1766.
- Rossignol, R. & Karbowski, M. (2009).** Editorial of the directed issue on mitochondrial dynamics in biology and medicine. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**: 1748-1749.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L. & van der Blik, A. M. (2001).** Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Molecular biology of the cell* **12**: 2245-2256.
- Spacek, T., Santorova, J., Zacharovova, K., Berkova, Z., Hlavata, L., Saudek, F. & Jezek, P. (2008).** Glucose-stimulated insulin secretion of insulinoma INS-1E cells is associated with elevation of both respiration and mitochondrial membrane potential. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**: 1522-1535.
- St Charles, R., Harrison, R. W., Bell, G. I., Pilkis, S. J. & Weber, I. T. (1994).** Molecular model of human beta-cell glucokinase built by analogy to the crystal structure of yeast hexokinase B. *Diabetes* **43**: 784-791.
- Thorens, B. (2004).** Mechanisms of glucose sensing and multiplicity of glucose sensors. *Ann Endocrinol (Paris)* **65**: 9-12.
- Tiedge, M., Krug, U. & Lenzen, S. (1997).** Modulation of human glucokinase intrinsic activity by SH reagents mirrors post-translational regulation of enzyme activity. *Biochimica et biophysica acta* **1337**: 175-190.
- Tiedge, M. & Lenzen, S. (1996).** Effects of sodium butyrate on glucose transporter and glucose-phosphorylating enzyme gene expression in RINm5F insulinoma cells. *Journal of molecular endocrinology* **17**: 19-26.
- Tiedge, M., Lortz, S., Munday, R. & Lenzen, S. (1998).** Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* **47**: 1578-1585.
- Tiedge, M., Richter, T. & Lenzen, S. (2000).** Importance of cysteine residues for the stability and catalytic activity of human pancreatic beta cell glucokinase. *Archives of biochemistry and biophysics* **375**: 251-260.
- Tiedge, M., Steffek, H., Elsner, M. & Lenzen, S. (1999).** Metabolic regulation, activity state, and intracellular binding of glucokinase in insulin-secreting cells. *Diabetes* **48**: 514-523.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B. F., Yuan, J., Deeney, J. T., Corkey, B. E. & Shirihai, O. S. (2008a).** Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *The EMBO journal* **27**: 433-446.
- Twig, G., Graf, S. A., Wikstrom, J. D., Mohamed, H., Haigh, S. E., Elorza, A., Deutsch, M., Zurgil, N., Reynolds, N. & Shirihai, O. S. (2006).** Tagging and tracking individual networks within a complex mitochondrial web with photoactivatable GFP. *American journal of physiology* **291**: C176-184.

- Twig, G., Hyde, B. & Shirihai, O. S. (2008b).** Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochimica et biophysica acta* **1777**: 1092-1097.
- van Schaftingen, E., Veiga-da-Cunha, M. & Niculescu, L. (1997).** The regulatory protein of glucokinase. *Biochemical Society transactions* **25**: 136-140.
- Waldhäusl, W. & Lenzen, S. (2007).** Kohlenhydrat-Stoffwechsel. In Pathophysiologie: Molekulare, zelluläre, systemische Grundlagen von Krankheiten, Wilhelm Maudrich Verlag, Wien 14-11 14-19.
- Wang, H. & Iyedjian, P. B. (1997).** Acute glucose intolerance in insulinoma cells with unbalanced overexpression of glucokinase. *The Journal of biological chemistry* **272**: 25731-25736.
- Wikstrom, J. D., Katzman, S. M., Mohamed, H., Twig, G., Graf, S. A., Heart, E., Molina, A. J., Corkey, B. E., de Vargas, L. M., Danial, N. N., Collins, S. & Shirihai, O. S. (2007).** beta-Cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels. *Diabetes* **56**: 2569-2578.
- Wikstrom, J. D., Twig, G. & Shirihai, O. S. (2009).** What can mitochondrial heterogeneity tell us about mitochondrial dynamics and autophagy? *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**: 1914-1927.
- Willems, P. H., Smeitink, J. A. & Koopman, W. J. (2009).** Mitochondrial dynamics in human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**: 1773-1782.
- Wu, L., Nicholson, W., Knobel, S. M., Steffner, R. J., May, J. M., Piston, D. W. & Powers, A. C. (2004).** Oxidative stress is a mediator of glucose toxicity in insulin-secreting pancreatic islet cell lines. *The Journal of biological chemistry* **279**: 12126-12134.
- Yoon, Y., Krueger, E. W., Oswald, B. J. & McNiven, M. A. (2003).** The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Molecular and cellular biology* **23**: 5409-5420.
- Zelent, D., Najafi, H., Odili, S., Buettger, C., Weik-Collins, H., Li, C., Doliba, N., Grimsby, J. & Matschinsky, F. M. (2005).** Glucokinase and glucose homeostasis: proven concepts and new ideas. *Biochemical Society transactions* **33**: 306-310.
- Zhang, J., Li, C., Chen, K., Zhu, W., Shen, X. & Jiang, H. (2006).** Conformational transition pathway in the allosteric process of human glucokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 13368-13373.

6 Publikationen

Teilergebnisse der vorliegenden Dissertation sind bereits veröffentlicht.

Kurzbeiträge:

Schmitt H., Lenzen S., Baltrusch S. (2005) Aus der Avocado-Frucht isolierte Mannoheptulose und Perseitol zeigen eine signifikante Hemmung der Glucokinase-Enzymaktivität. 2005, präsentiert auf dem 8. Inselworkshop, Goslar, 2005

Schmitt H., Langer S., Lenzen S., Baltrusch S. (2006) Regulierbare Expression des Glucosesensors Glucokinase zur Analyse des Glucosemetabolismus in insulinproduzierenden Zellen, *Diabetologie und Stoffwechsel* **15**, Suppl. 1, S 37, 049, 2006, 41. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Leipzig, 2006

Schmitt H., Lenzen S., Baltrusch S. (2007) Bedeutung von kompetitiven Glucokinaseinhibitoren in der Aufklärung der Glucosesensorfunktion der Glucokinase in insulinproduzierenden Zellen. *Diabetologie und Stoffwechsel* **16**, Suppl. 1, S 117, P340, 2007, 42. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Hamburg, 2007

Schmitt H., Lenzen S., Baltrusch S. (2007) Involvement of glucokinase in glucose toxicity in insulin-producing beta cells. *Diabetologia* **50**, Suppl. 1, S 182, 427, 2007, 43. EASD Annual Meeting, Amsterdam, 2007

Schmitt H., Lenzen S., Baltrusch S. (2008) Einfluß der Überexpression der Glucokinase auf den Glucosemetabolismus in insulinproduzierenden β -Zellen bezüglich der Glucose Toxizität. *Diabetologie und Stoffwechsel* **17**, Suppl. 1, S 6, 008, 2008, 43. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, München, 2008

Schmitt H., Lenzen S., Baltrusch S. (2008) Lipotoxicity in insulin-producing beta cells is neither amplified by high glucose nor mediated by glucokinase. *Diabetologia* **51**, Suppl. 1, S 217, 529, 44. EASD Annual Meeting, Rom, 2008

Schmitt H., Lenzen S., Baltrusch S. (2009) Der Einfluss der Glucokinaseexpression auf den mitochondrialen Stoffwechsel von insulinproduzierenden β -Zellen. *Diabetologie und Stoffwechsel* **18**, Suppl. 1, S , 2008, 44. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Leipzig, 2009

Schmitt H., Lenzen S., Baltrusch S. (2009) Einfluss der Glucokinaseexpression auf den mitochondrialen Stoffwechsel von insulinproduzierenden Beta-Zellen. 2009, präsentiert auf dem 9. Inselworkshop, Greifswald, 2009

Schmitt H., Lenzen S., Baltrusch S. (2009). Role of mitochondrial fission and fusion in beta cell stimulus secretion coupling. *Diabetologia* **5**, Suppl. 1, S. 182, 449, 45. EASD Annual Meeting, Wien, Oktober 2009

Veröffentlichungen:

Kappler-Tanudyaya N.; Schmitt H.; Meyer L.; Lenzen S.; Ulber R. (2008). Combination of biotransformation and chromatography for the isolation and purification of mannoheptulose, *Biotechnology Journal* 2007, **2 (6)**: 647 – 767

7 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Heike Schmitt
Anschrift: Weckenstr. 9
30451 Hannover
Geburtsdatum und –ort: 11. Januar 1977 in Bamberg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1983 – 1987 Grundschule Martinschule in Bamberg
1987 – 1996 Kaiser-Heinrich-Gymnasium in Bamberg
Abschluss: Abitur, Abschlussnote: 2,1

Berufsausbildung

08/1996 – 08/1998 Ausbildung zur Biologisch- technischen Assistentin an den
Sabine Blindow Schulen Hannover

Studium

09/1999 – 07/2003 Studium der Milchwirtschaftlichen Lebensmitteltechnologie an
der Fachhochschule Hannover
Abschluss: Diplom-Ingenieurin (FH), Abschlussnote: 2,7
Diplomarbeit mit dem Thema: „Isolierung und Synthese von
D- Mannoheptulose – einer pharmakologisch hochwirksamen
C₇-Verbindung“ am Institut für Technische Chemie, Universität
Hannover
04/2004 – 03/2005 Studium der Chemie an der Universität Hannover
Abschluss: Kenntnisstandprüfung

Berufliche Tätigkeit

10/1998 – 08/1999	BTA bei der Firma LipoNova GmbH, Hannover
07/2003 – 01/2004	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Klinische Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover
02/2004 – 06/2004	BTA am Institut für Klinische Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover
Seit 07/2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Klinische Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover

Promotion

Seit 05/2005	Promotion mit dem Thema: „Die Rolle des Glucosensensors Glucokinase im Glucosemetabolismus und mitochondrialen Stoffwechsel in Beta-Zellen“ am Institut für Klinische Biochemie, Medizinische Hochschule Hannover
--------------	---

Die vorliegende Dissertation wurde im Mai 2005 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. S. Lenzen am Institut für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover begonnen und im Dezember 2009 abgeschlossen.

8 Erklärung

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

**Die Rolle des Glucosesensors Glucokinase im Glucosemetabolismus und
mitochondrialen Stoffwechsel in Beta-Zellen**

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 16.12.2009

Heike Schmitt

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Sigurd Lenzen

danke ich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und –materialien, seine hilfreiche Unterstützung und sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit. Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Sigurd Lenzen für das mir entgegengebrachte Vertrauen und sein außerordentliches Engagement im Laufe der Dissertation.

Frau Prof. Dr. Simone Baltrusch

danke ich für die vielen wertvollen Gespräche, die stets hilfreiche Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit und die außerordentlich gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Glucokinase. Ihre stetige Diskussionsbereitschaft hat zu einem großen Anteil zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Allen Doktoranden, Mitarbeitern und Gästen des Institutes für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft während der Durchführung der Arbeit.

Dr. Ortwin Naujok danke ich für seine ständige Hilfsbereitschaft bei jeglichen Problemen, die vielen wertvollen Gespräche in dieser Zeit und die nicht enden wollenden Fragen, die ich ihm im Laufe der Promotion stellen durfte.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Matthias Elsner und Dr. Stephan Lortz sowie Sara Langer, Wiebke Gehrman, Martin Kaminski, Ilir Mehmeti, Maren Böger, Monika Funck, Jasmin Kresse, Britta Leß, Anke Possler, Tanja Arndt, Ute Sommerfeld und Martin Wirth für die wertvolle Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung während der Promotion.