

Funktionelle Bedeutung der Guanylat-Zyklase C der pankreatischen b-Zelle

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Urs Egner
geboren am 15. Januar 1973 in Berlin

2001

Lebenslauf

Urs Egner

Geburtsdatum	15. Januar 1973	Geburtsort	Berlin
Familienstand	ledig	Kinder	Leoni Michelle Egner geb. 03. Dezember 1999

Schulbildung

September 1979 – Juli 1981	Botschaftsschule der DDR in Moskau
September 1981 – Juli 1989	POS mit erweitertem Russischunterricht "Edgar André" in Berlin
September 1989 – Juni 1991	Institut zur Vorbereitung auf das Auslandsstudium der Martin-Luther-Universität zu Halle/Wittenberg Abschluss: Abitur

Wehrdienst

Juli 1991 - September 1992	Soldat auf Monate (SaM 15)
----------------------------	----------------------------

Studium der Biologie

Oktober 1992 - Juni 1998	Georg-August-Universität Göttingen
Juli 1995 - April 1996	Universidad Nacional de Heredia (Costa Rica)
Juli 1994	Vordiplomprüfung
Juni 1998	Diplomprüfung

Diplomarbeit

Juli 1997 - Juni 1998	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, Abteilung Phytoantikörper
-----------------------	--

Promotion

Juli 1998 - Dezember 2000	IPF PharmaCeuticals GmbH, Hannover im Graduiertenkolleg „Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine“ der Medizinischen Hochschule Hannover
---------------------------	--

Auslandsaufenthalte

September 1976 - Juni 1981	Moskau (Besuch des russischen Kindergartens und der deutschen Botschaftsschule)
Februar 1995 - April 1995	Equador/Galapagos (Darwin-Station)
Juli 1995 - April 1996	Universidad Nacional de Heredia (Costa Rica) (im Rahmen eines DAAD-geförderten Studentenaustausches)
Juli 1998 - Dezember 1998	Zürich (Schweiz), Forschungen am Anatomischen Institut (Abt. Neuroendokrinologie) der Universität Zürich-Irchel im Rahmen des Promotionsstudiums

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen habe ich vollständig angegeben. Ich versichere ferner, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, 01.12.2000

Urs Egner

Referent: Prof. Dr. Walter Müller
Korreferent: PD. Dr. Markus Meyer
Tag der Promotion: 12.01.2001
Datum der Veröffentlichung: Januar 2001

*Meinen Eltern,
Nadine und Leoni Michelle sowie
Origio hominis sapientis*

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt **Erik** (IPF PharmaCeuticals GmbH) dessen umfangreiche wissenschaftliche Betreuung und dessen steter Rat in methodischen Fragen maßgeblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Markus (IPF PharmaCeuticals GmbH) danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und für seinen stets freundschaftlichen Rat.

Herrn **Prof. Dr. Wolf-Georg Forssmann** (IPF PharmaCeuticals GmbH) danke ich für die Überlassung des Themas, **Knut** für die Koordination meines Projektes mit anderen der GC-C Projektserie.

Herrn **Prof. Dr. Walter Müller** danke ich für die Übernahme des Referats.

Herrn **Prof. Dr. Manfred Reinecke** und seiner Arbeitsgruppe am Anatomischen Institut der Universität Zürich-Irchel danke ich für die Gastfreundschaft und alle mir zuteil gewordene Unterstützung von Juli bis Dezember 1998.

Axel danke ich für die Peptidsynthese, **Andrea** dafür, daß sie die ersten, etwas frustrierenden Erfahrungen mit Western Blots mit mir geteilt hat und **Antonietta** für ihre Unterstützung in der Zellkultur.

Bei den Kollegiaten und Betreuern des Grauiertenkollegs „Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine“ möchte ich mich für die Tagungen auf Gut Sunden bedanken.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABSTRACT	1
1. ZUSAMMENFASSUNG	2
2. EINLEITUNG.....	4
2.1. GUANYLATZYKLASEN	4
2.2. DIE GUANYLATZYKLASE C.....	4
2.3. LIGANDEN DER GC-C	5
2.3.1. <i>STa</i>	5
2.3.2. <i>Guanylin</i>	6
2.3.3. <i>Uroguanylin</i>	8
2.4. MOLEKULARE MECHANISMEN UND INTESTINALE BEDEUTUNG DER GC-C.....	9
2.5. DIE LANGERHANS'SCHE INSEL	10
2.5.1. <i>Evolution der Langerhans'schen Inseln</i>	10
2.5.2. <i>Morphologie und Physiologie der Langerhans'schen Insel</i>	12
2.6. DAS PEPTIDHORMON INSULIN.....	14
2.7. PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON INSULIN.....	15
2.8. BEKANNTE MECHANISMEN DER INSULINFREISETZUNG	16
2.9. NACHWEIS VON GUANYLIN UND GC-C IN DER LANGERHANS'SCHEN INSEL	20
2.10. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	22
3. MATERIAL & METHODEN	23
3.1. MATERIAL	23
3.1.1. <i>Laborgeräte und Apparaturen</i>	23
3.1.2. <i>Enzyme und Reagentiensätze (Kits)</i>	24
3.1.3. <i>Antikörper</i>	25
3.1.4. <i>Lösungen und Puffer</i>	26
3.2. ARBEITEN AUF RNA/DNA-EBENE	26
3.2.1. <i>Arbeiten mit RNA</i>	26
3.2.2. <i>Standard PCR</i>	27
3.2.3. <i>Real-time TaqMan™ PCR</i>	28
3.2.4. <i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	29
3.2.5. <i>Reverse Transkription</i>	30
3.2.6. <i>Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA</i>	30
3.2.7. <i>Genotypisierung von GC-C-knock-out- und Wildtyp-Mäusen</i>	31
3.2.8. <i>RNA-Präparation</i>	32
3.3. ARBEITEN AUF PEPTID/PROTEIN-EBENE	32
3.3.1. <i>Proteinpräparation</i>	32
3.3.2. <i>Proteingelelektrophorese (Tris-Glycin-SDS-PAGE)</i>	32
3.3.3. <i>Coomassie-Färbung</i>	34
3.3.4. <i>Western Blot / Immunoblot</i>	34
3.4. WEITERE ARBEITEN AUF MOLEKULARER EBENE	36
3.4.1. <i>Insulin-ELISA</i>	36
3.4.2. <i>ELISA für zyklische Nukleotide (cAMP- und cGMP-ELISA)</i>	38
3.4.3. <i>Messung von Kationenkonzentrationen in wässrigen Lösungen</i>	38

3.4.4.	Messung von Chloridionenkonzentrationen in wässrigen Lösungen.....	38
3.4.5.	Messung von zytosolischen Kalziumkonzentrationen an Einzelzellen.....	39
3.5.	ARBEITEN AUF ZELLULÄRENER EBENE.....	40
3.5.1.	Isolation Langerhans'scher Inseln aus Ratten und Mäusen.....	40
3.5.2.	Gewebekultur Langerhans'scher Inseln.....	40
3.5.3.	Sekundärkultur von INS-1-Zellen.....	40
3.5.4.	Perifusion.....	41
3.5.5.	Inkubationsexperimente.....	41
3.6.	ARBEITEN MIT TIEREN.....	42
3.6.1.	Organentnahme aus Mäusen und Ratten.....	42
3.6.2.	Stoffwechseluntersuchungen an Mäusen.....	42
3.7.	STATISTIK.....	43
4.	ERGEBNISSE.....	44
4.1.	DIE GC-C-KNOCK-OUT-MAUS.....	44
4.2.	PHYSIOLOGISCHER VERGLEICH VON GC-C-KNOCK-OUT-MÄUSEN UND WILDTYP-MÄUSEN	45
4.2.1.	Haltung von GC-C-knock-out-Mäusen in Stoffwechselkäfigen.....	46
4.2.2.	Glukosetoleranztest.....	47
4.3.	ZELL- UND MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN.....	50
4.3.1.	Guanylin induziert eine Insulinfreisetzung aus pankreatischen b -Zellen.....	50
4.3.2.	Auch Uroguanylin und STa setzen Insulin aus pankreatischen b -Zellen frei.....	50
4.3.3.	Wirksamkeit der "langen" Form von Guanylin (22-115) auf die Insulinfreisetzung	51
4.3.4.	aus INS-1-Zellen.....	51
4.3.4.	Die insulinotropen Wirkungen von Glukose und Guanylin sind additiv.....	52
4.3.5.	Die GC-C ist essentiell für die guanylininduzierte Insulinfreisetzung.....	53
4.3.6.	Zyklische Nukleotide und die Insulinfreisetzung.....	55
4.3.7.	Insulinfreisetzung aus INS-1-Zellen nach Applikation von 8-Br-cGMP.....	58
4.3.8.	Detektion cGMP-bindender Proteine im Western Blot.....	58
4.3.9.	Insulinfreisetzung durch Guanylin nach Inhibition der Proteinkinase-G.....	59
4.3.10.	Einfluß von Guanylin auf die zytosolische Ca ⁺⁺ -Konzentration.....	61
4.3.11.	Einfluß von Guanylin in Verbindung mit Rp-8-Br-PET-cGMPS auf die zytosolische	63
4.3.12.	Ca ⁺⁺ -Konzentration.....	63
4.3.12.	Einfluß von Guanylin in Verbindung mit Glibenclamid auf die zytosolische Ca ⁺⁺ -	65
4.3.12.	Konzentration.....	65
4.4.	REGULATION DES INSULINGENS DURCH GUANYLATZYKLASE-AKTIVIERUNG?.....	65
5.	DISKUSSION.....	68
5.1.	ALLGEMEINES ZUM GUANYLIN-GC-C-SYSTEM DER PANKREATISCHEN β -ZELLE.....	68
5.2.	PHÄNOTYP DER GC-C-KNOCK-OUT-MÄUSE.....	73
5.2.1.	Veränderungen des Elektrolyt-Haushaltes.....	73
5.2.2.	Herabsetzung der Glukosetoleranz durch Fehlen der GC-C.....	73
5.3.	DIE SIGNALTRANSDUKTION VON GUANYLIN ZUM INSULIN.....	74
5.3.1.	Wirkung von 8-Br-cGMP.....	74
5.3.2.	"Cyclic nucleotide crosstalk" - in b -Zellen nicht nachweisbar.....	74
5.3.3.	Die Aktivierung der PKG führt zur zytosolischen Kalziumanreicherung.....	76
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	78

Abkürzungsverzeichnis

add.	addieren zu (zugeben bis)
AK	Antikörper
AS	Aminosäure/n
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines (Rinder-) Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
Da	Dalton
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GC	Guanylatzyklase
kb	Kilobase/n
kDa	Kilodalton (siehe auch Da)
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDE	Phosphodiesterase
PP	Polypropylen
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Trihydroxymethylaminomethan

Abstract

The current work shows that guanylate cyclase C (GC-C) has an influence on insulin secretion in the pancreatic β -cell. The insulinotropic effect is mediated by the endogenous GC-C ligands guanylin and uroguanylin as well as an exogenous ligand, the heat-stable enterotoxin (STa) from E.coli. Incubation experiments in isolated islets of Langerhans from wild type and GC-C knockout mice showed that GC-C is essential for guanylin-mediated insulin secretion. In subsequent experiments, the signal transduction cascade was analyzed. Measurements of the second messengers cAMP and cGMP by ELISA showed that guanylin elevates cGMP-, but not cAMP-levels. The next step was the estimation of the presence of cGMP target proteins in our β -cell model, the INS-1 cell line, by Western blot. Whereas relevant phosphodiesterases were not detectable, the cGMP-dependent protein kinases (PKG) type I and II were found. Using the specific PKG inhibitor Rp-8-Br-PET-cGMPS it was next shown that the guanylin-dependent insulin release is also PKG-dependent. Direct measurements of intracellular calcium in living cells revealed that, after activation of PKG, calcium enters the cells from the extracellular space. In experiments with glibenclamide, an inhibitor of the ATP-dependent potassium channel it could also be proved that intracellular calcium stores are not directly involved in the guanylin-dependent insulin secretion. All in all, the present work presents a novel previously undescribed cGMP-dependent release mechanism for insulin release.

The *in vivo* experiments in GC-C knockout mice revealed a phenotype different from the wild type. Firstly, there were differences in salt excretion and, secondly, the GC-C knockout mice showed diabetic tendencies in glucose tolerance tests. In brief, the excretion of calcium via the faeces and urine was elevated, whereas the sodium excretion in the faeces was lowered. The glucose tolerance tests showed that oral application of glucose was compensated much faster in the wild type than in the GC-C knockout mice in terms of the height of the primary glucose level as well as the time for recovery.

Key words: Guanylate Cyclase C (GC-C), Insulin, pancreatic β -cell

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Guanylatzyklase C (GC-C) der pankreatischen β -Zelle einen Einfluß auf die Insulinsekretion hat. Der insulinotrophe Effekt wird durch die endogenen Liganden der GC-C Guanylin und Uroguanylin, wie auch durch die exogenen Liganden, die hitzestabilen Enterotoxine (STa), ausgelöst. In Inkubationsversuchen an isolierten Langerhans'schen Inseln aus GC-C-knock-out-Mäusen und Wildtyp-Mäusen konnte gezeigt werden, daß die GC-C essentiell für die guanylinvermittelte Insulinfreisetzung ist. In der folgenden Funktionsanalyse wurde die Signaltransduktionskaskade näher charakterisiert. Durch Messung der *second messenger* cAMP und cGMP im ELISA konnte gezeigt werden, daß Guanylin die zytosolischen cGMP-Level erhöht. Im Folgenden wurde überprüft, welches der bekannten Zielproteine von cGMP in INS-1-Zellen – dem herangezogenen β -Zellmodell – im Western-Blot nachweisbar sind. Im Gegensatz zu diversen Phosphodiesterasen konnten die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG) I und II nachgewiesen werden. Unter Verwendung des spezifischen Inhibitors Rp-8-Br-PET-cGMPS konnte in Inkubationsexperimenten gezeigt werden, daß die guanylinabhängige Insulinfreisetzung PKG-abhängig ist. In folgenden Experimenten stellte sich heraus, daß es nach der Aktivierung der PKG zu einem Einstrom von Kalziumionen aus dem Extrazellularraum kommt. Dies wurde durch die direkte Messung der zytosolischen Kalziumkonzentration bestätigt. Allein intrazelluläre Kalziumspeicher führen nicht zu einer guanylinabhängigen Insulinsekretion, wie in Experimenten mit dem Inhibitor des ATP-abhängigen Kaliumkanals Glibenclamid festgestellt werden konnte. Somit konnte ein bisher nicht beschriebener, cGMP-abhängiger, Freisetzungsmechanismus für Insulin gezeigt und charakterisiert werden. *In vivo*-Untersuchungen an GC-C-knock-out-Mäusen zeigten einen Phänotyp. Zum einen konnten Veränderungen des Elektrolythauhaltes festgestellt werden, zum anderen zeigen die GC-C-knock-out-Mäuse diabetische Tendenzen im Glukosetoleranztest. Experimente zum Elektrolythaushalt ergaben, daß die Kalziumausscheidung über den Kot wie auch die Kalziurese in GC-C-knock-out-

Mäusen erhöht sind; die Natriumausscheidung über den Kot ist hingegen verringert. Die Glukosetoleranztests ergaben, daß die Blutglukosekonzentration von GC-C-knock-out-Mäusen durch orale Glukosegabe stärker beeinflußt werden, als die entsprechender Wildtyp-Mäuse. Dies betrifft sowohl die Stärke des primären Anstiegs der Blutglukosekonzentration, wie auch die Dauer der Renormalisierung.

Schlagwörter: Guanylatzyklase C (GC-C), Insulin, pankreatische b-Zelle

2. Einleitung

Untersuchungen über membranäre Guanylatzyklen und ihre regulatorischen Peptide ergaben, daß sowohl Guanylin als auch sein Rezeptor, die Guanylatzyklase C, in den Langerhans'schen Inseln exprimiert sind. Ausgehend von dieser Beobachtung wurde im Laufe der Arbeit detailliert analysiert, ob dieses Guanylin-Guanylatzyklase C-System im endokrinen Pankreas eine funktionelle Bedeutung hat.

2.1. Guanylatzyklen

Guanylatzyklen (GCs) katalysieren die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). Bisher wurden acht verschiedene GCs identifiziert und charakterisiert. Man geht davon aus, daß noch weitere Rezeptoren dieser Familie existieren [1]. Die GCs werden in zwei Gruppen eingeteilt: lösliche GCs (zytosolische GCs) und partikuläre GCs (membranständige GCs) [2, 3]. Die partikulären GCs bestehen aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer katalytischen Domäne. Alle sechs bisher charakterisierten partikulären GCs zeichnen sich durch eine hohe Sequenzhomologie im intrazellulären Bereich aus, während sich die extrazellulären Domänen deutlich voneinander unterscheiden [4, 5]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich auf die GC-C eingegangen.

2.2. Die Guanylatzyklase C

Die Guanylatzyklase C wurde 1990 von der Arbeitsgruppe Garbers durch Klonierung der cDNA aus der Ratte erstmals in ihrer Primärstruktur aufgeklärt [6]. Durch Untersuchungen an GC-C-knock-out-Mäusen konnte nachgewiesen werden, daß die GC-C der Rezeptor für das hitzestabile Enterotoxin (STa) aus *Escherichia coli* ist [7, 8].

Das Expressionsmuster der GC-C ist in den letzten Jahren ausführlich untersucht worden. Die GC-C-mRNA konnte im Jejunum, Ileum und Kolon der adulten Ratte

detektiert werden [6, 9, 10]. Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen die GC-C auch extraintestinal nach. Ergebnisse verschiedener Gruppen zeigten eine Expression in der fetalen Leber, im Hoden, in der Plazenta [9] sowie in der Nebenniere der Ratte [11]. Im Opossum wurde die GC-C in der Niere, den Atemwegen und der Leber nachgewiesen [12, 13]. Da diese Organe nicht direkt in Zusammenhang mit der Wirkung bakterieller Enterotoxine gestellt werden konnten, lag die Vermutung nahe, daß endogene Liganden existieren, die über den Blutweg diese Rezeptoren erreichen.

2.3. Liganden der GC-C

2.3.1. STa

Hitzestabile Enterotoxine (ST) sind von Enterobakterien sezernierte Peptide. Im Gegensatz zum Cholera-toxin, das über den intrazellulären Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) wirkt, erzielen hitzestabile Enterotoxine z.B. ihre sekretorische Wirkung im Darm über den intrazellulären *second messenger* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) [14]. Strukturell zeichnen sich diese Moleküle durch eine hohe Homologie hinsichtlich ihrer C-terminalen Aminosäuresequenz sowie durch ihre charakteristischen Cysteinverbrückungen aus.

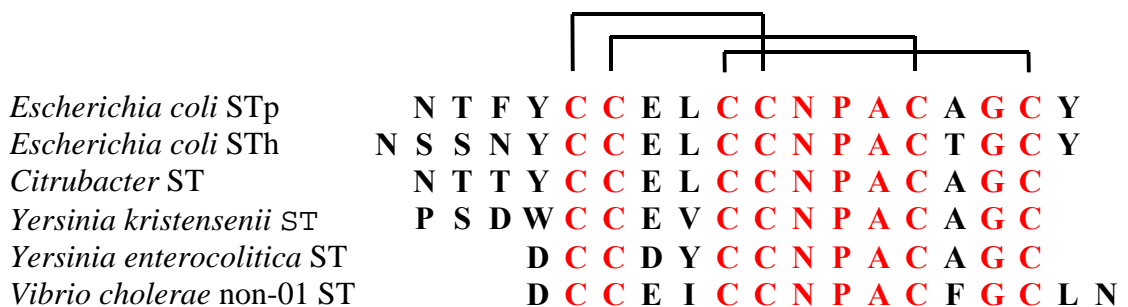


Abb. 1: Vergleich der Aminosäuresequenzen hitzestabiler Enterotoxine. Bereiche vollständiger Homologie sind rot gekennzeichnet. Ausgebildete Disulfidverbrückungen sind durch Klammern dargestellt.

Auf die pathophysiologische Bedeutung der hitzestabilen Enterotoxine wird im Kapitel "Intestinale Bedeutung der GC-C" näher eingegangen.

2.3.2. Guanylin

Nach der Identifizierung der GC-C als STa-Rezeptor kam zwangsläufig die Frage nach einem oder mehreren endogenen Liganden mit für den Organismus sinnvollen physiologischen Funktionen auf [6]. Zur Detektion von Liganden wurde die humane Kolon-Karzinom-Zelllinie T84 etabliert. Diese Zelllinie exprimiert das GC-C-Gen konstitutiv endogen [15]. Die GC-C ist die einzig exprimierte, bekannte Guanylatzyklase (GC) in T84-Zellen. Dies ging aus Stimulationsversuchen mit Liganden aller bekannten GCs, wie natriuretischen Peptiden und den Aktivatoren der löslichen GCs, hervor. In diesen Experimenten führte nur die Applikation von STa zu einer Erhöhung der zytosolischen cGMP-Konzentration [16]. Somit bot die T84-Zelllinie optimale Voraussetzungen zum Screening nach endogenen GC-C-Liganden. 1992 gelang es Currie et al. [17], unter Verwendung dieses Systems ein biologisch aktives Peptid - Guanylin - aus Extrakten des Ratten-Jejunums zu isolieren. Dieses zuerst aufgereinigte Ratten-Guanylin war 15 Aminosäuren lang und wies zwei Disulfidbrücken auf [25]. Vergleichende Analysen der Primär- und Sekundärstruktur von Guanylin und STa ergaben Übereinstimmungen. Neben einer dritten Disulfidbrücke im STa sind die zwei Disulfidbrücken des Guanylins konserviert. Identische Bereiche der Aminosäuresequenz finden sich vor allem in den C-terminalen Bereichen beider Peptide (Abb. 2).

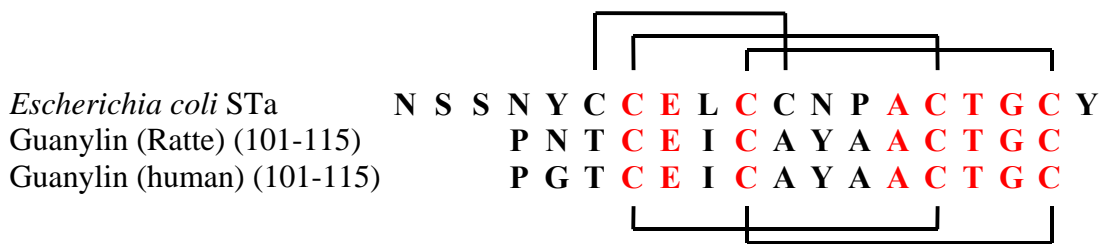


Abb. 2: Vergleich der Aminosäuresequenzen des hitzestabilen Enterotoxins (STa) und dem C-terminalen Ende von Guanylin. In Klammern ist der AS-Abschnitt aus dem korrespondierenden Präprohormon angegeben. Bereiche vollständiger Homologie sind rot gekennzeichnet. Ausgebildete Disulfidverbrückungen sind durch Klammern dargestellt.

Diese Befunde lassen darauf schließen, daß hitzestabile Enterotoxine eine "molekulare Mimikry" bezüglich des endogenen Liganden Guanylin ausüben. In

Kompetitionsassays an T84-Zellen konnte die Bindung von Guanylin und STa an identische Bindungsstellen nachgewiesen werden. Guanylin zeigte bezüglich der Aktivierung der GC-C allerdings eine geringere Potenz als STa [17]. Es wurde postuliert, daß Guanylin ins Darmlumen sezerniert wird und auf parakrine Weise den Elektrolythaushalt reguliert [17, 18, 19]. Die Klonierung der humanen sowie der Ratten- und Maus-Guanylin-cDNA gelang ebenfalls 1992 [11, 18, 19, 20]. Sie kodieren für 115 AS (Mensch, Ratte) bzw. 116 AS (Maus) große Prohormone. Diese weisen N-terminal Sequenzen auf, die typisch für sekretorische Proteine sind. Die Sequenz des biologisch aktiven Guanylins findet sich C-terminal in den Prohormonen. Die Kenntnis der cDNA- und Aminosäuresequenzen ermöglichten es, die gewebespezifische Verteilung Guanylins auf Nukleinsäure- und auf Proteinebene präzise zu untersuchen. Als Hauptsyntheseort stellte sich der Darm heraus. Bei Maus und Ratte ist ein Anstieg der Guanylinexpression vom Duodenum zum Kolon hin zu verzeichnen [18, 20, 18, 21]. Desweiteren konnte Guanylin-mRNA in geringen Mengen in der Niere, der Nebenniere, dem Uterus und dem Ovidukt der Ratte sowie der Niere der Maus nachgewiesen werden [11, 19, 20]. In einer Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen des IPF und des Anatomischen Instituts der Universität Zürich-Irchel konnte Guanylin immunhistochemisch in den α -Zellen Langerhans'scher Inseln nachgewiesen werden (unpublizierte Daten). Neueste Studien belegen eine Guanylinexpression in der Adenohypophyse von Ratten [22]. *In situ* Hybridisierungen von Ratten-Gewebeproben zeigten eine hohe Guanylinexpression in den Enterozyten an der Spitze der Dünndarmzotten und eine schwache Expression in den Epithelzellen der Lieberkühn'schen Drüsen [10, 23]. Im Gegensatz hierzu konnten im Menschen hohe Expressionslevel in den Panethzellen des unteren Bereiches der Dünndarmkrypten detektiert werden [20]. Desweiteren wurde Guanylin durch Li et al. in den Goblet-Zellen der Ratte nachgewiesen [24]. Dieser Zelltyp ist entscheidend an der Synthese der das Epithel schützenden Muzinschicht beteiligt.

Bezüglich der Prozessierung des Vorläuferproteins zum biologisch aktiven Guanylin liegen widersprüchliche Daten vor. Während De Sauvage et al. keine Bioaktivität des Proguanylins (hGuanylin 22-115) feststellen konnten [20], wurde es durch Kuhn et al. als biologisch aktive Guanylinvorstufe isoliert [25]. Eine Prozessierung durch

Ektoenzyme der Zielzelle im Bioassay kann jedoch hierbei nicht ausgeschlossen werden.

2.3.3. Uroguanylin

Uroguanylin ist der zweite isolierte endogene Ligand der GC-C. Es wurde im Urin des Opossums [26] und in humanem Urin beschrieben [27]. Die 15 AS bzw. 16 AS langen Peptide zeigen eine Sequenzhomologie von 53 % zu humanem Guanylin (Abb. 3).

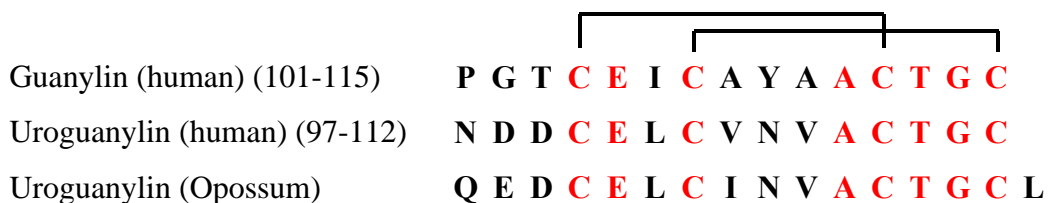


Abb. 3: Vergleich der C-terminalen Aminosäuresequenzen von humanem Guanylin mit denen von humanem und Opossum-Uroguanylin. In Klammern ist der AS-Abschnitt aus dem korrespondierenden Prärohormon angegeben. Bereiche vollständiger Homologie sind rot gekennzeichnet. Ausgebildete Disulfidverbrückungen sind durch Klammern dargestellt.

Durch Hamra [26] und Kita [27] konnte analog zu Guanylin mit Hilfe des T84-Zell-Bioassays gezeigt werden, daß Uroguanylin und STa um den gleichen Rezeptor konkurrieren. Aus humanem Hämofiltrat wurde eine N-terminal um acht AS verlängerte Form des Uroguanylins isoliert [28, 29]. Aus der klonierten cDNA konnte dann die vollständige Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Die isolierten Peptide stellen jeweils den C-Terminus dar [30]. Uroguanylin wird im gesamten Gastrointestinaltrakt exprimiert. Im Dünndarm ist die Expressionsrate deutlich höher als im Kolon [31, 32, 33, 34]. Somit weisen Guanylin und Uroguanylin ein komplementäres intestinales Expressionsmuster auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Uroguanylin eine regulatorische Funktion in der Magen- und Dünndarm-Sekretion ausübt. Dies liegt im Einklang mit Bindungsstudien zur pH-Abhängigkeit. Nach diesen Studien erhöht sich die Affinität der Bindung von Uroguanylin an die GC-C mit sinkendem pH-Wert [35].

Extraintestinal konnte Uroguanylin bei vergleichsweise geringen Expressionsniveaus in Niere, Leber, Pankreas, Herz und Lunge nachgewiesen werden [32, 33, 36]. *In vivo* und *in vitro* konnte festgestellt werden, daß Uroguanylin einen Einfluß auf die Natriuresis und Kaliuresis hat. Dies führte zu der Vermutung, Uroguanylin stelle eine endokrine, enterorenale Achse zwischen renaler Wasser- und Salzausscheidung und oraler Wasser- und Salzaufnahme dar [37, 38].

2.4. Molekulare Mechanismen und intestinale Bedeutung der GC-C

Die GC-C vermittelte intestinale Sekretion läßt sich folgendermaßen beschreiben:

Die Aktivierung der GC-C erfolgt durch die Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne. Die extrazelluläre Domäne präsentiert sich auf der luminalen Seite der Mucosa und ist hier zugänglich für die im Darmlumen in regulierter Konzentration vorkommenden endogenen Liganden Guanylin und Uroguanylin [39]. Auf die Aktivierung hin wird intrazellulär die Synthese von cGMP aus GTP katalysiert. cGMP ist der *second messenger* dieser Signaltransduktionskette [40]. Durch erhöhte zytosolische cGMP-Konzentrationen wird die ebenfalls membrangebundene cGMP-abhängige Proteinkinase II (PKG-II oder cGK-II) aktiviert [41]. Die PKG-II phosphoryliert unter ATP-Verbrauch den CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) - einen Chlorid-Kanal. In Folge der Phosphorylierung kommt es zur Aktivierung des CFTR und im weiteren zu einem Chlorid-Ionen Ausstrom ins Darmlumen (Abb. 4). Da die Aktivierung der GC-C durch STa um ein Vielfaches effizienter verläuft als durch die endogenen Liganden [42], kommt es in diesem Fall zu einer entsprechend stärkeren, unkontrollierten Ausschüttung von Chlorid-Ionen [8]. In direkter Folge kommt es zur Kofluktuatation von Natrium-Ionen. Dem osmotischen Gefälle folgend reichert sich auch Wasser im Darmlumen an. Es kommt zur sekretorischen Diarrhöe. In kürzester Zeit werden dem Körper auf diese Art und Weise große Mengen an Wasser und Elektrolyten entzogen. Aufgrund des geringen Körpergewichts und des darum sehr begrenzten Depots an Wasser und Elektrolyten stellt die sekretorische Diarrhöe insbesondere für Kinder eine Lebensgefahr dar. Noch heute ist deshalb diese Krankheit die weltweit häufigste Todesursache bei Kindern [43, 44].

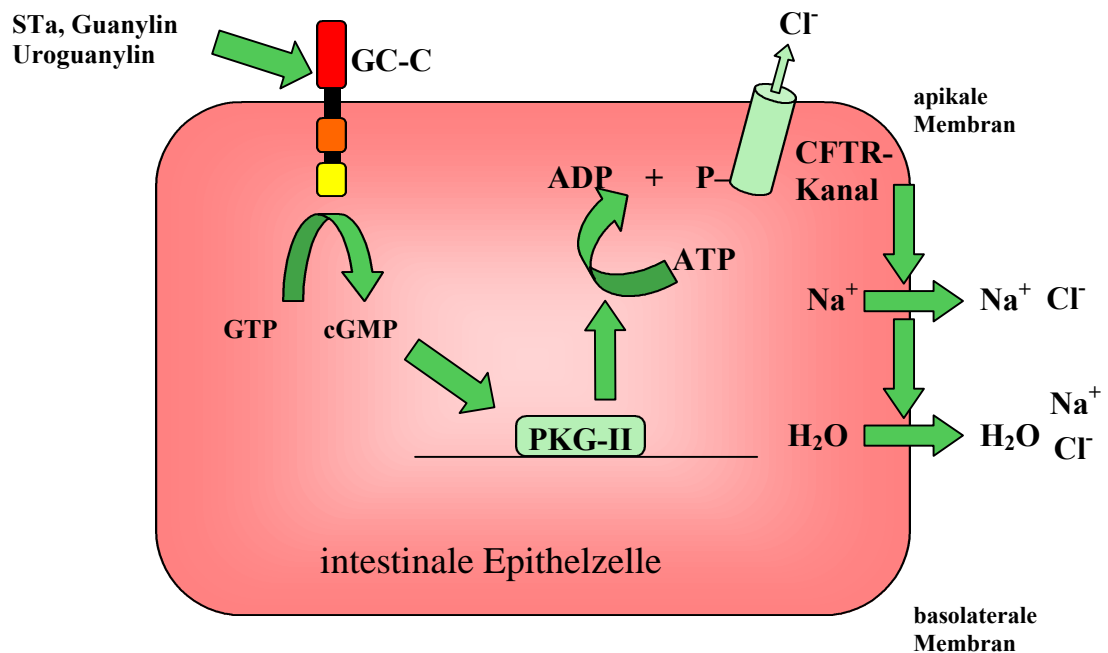


Abb. 4: Schematische Darstellung der Guanylin-vermittelten Wirkung am Modell der intestinalen Epithelzelle. Nach der Aktivierung der GC-C durch STa, Guanylin oder Uroguanylin kommt es über den *second messenger* cGMP und die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ II (PKG-II) zu einer Aktivierung des CFTR, eines Chloridkanals. Dem Ausstrom von Chlorid-Ionen ins Darmlumen folgen passiv Natrium-Ionen und Wasser.

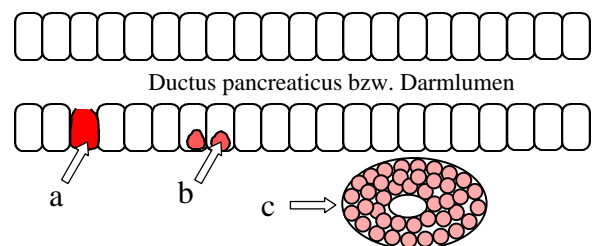
2.5. Die Langerhans'sche Insel

2.5.1. Evolution der Langerhans'schen Inseln

Mit dem Auftreten der ersten Wirbeltiere vor 600 Millionen Jahren erfuhr das neuroendokrine System eine bemerkenswerte Spezialisierung. Endokrine Zellen ergänzten sukzessiv die neurosekretorischen Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Diese endokrinen Zellen bilden teilweise kompakte epitheliale Drüsen wie etwa die Schilddrüse, die Nebenschilddrüse, die Hypophyse, die Nebennieren und das endokrine Pankreas. Die vier Inselhormone der Vertebraten konnten bereits im Nervensystem von Insekten nachgewiesen werden [45]. Beim höchstentwickelten Invertebraten und bereits zu den Cordaten zählenden Lanzettfischchen (*Branchiostoma lanceolatum*) finden sich erstmals "Inselhormonzellen" außerhalb

des Nervensystems. Insulin-, Glucagon-, Somatostatin- und pankreatisches Polypeptid- (PP) immunreaktive Zellen finden sich hier im Epithel des Verdauungstraktes [46]. Alle diese Zellen sind offenen Typs (Abb. 5). Sie zeigen keinerlei Tendenzen, durch die Basallamina hindurchzutreten oder von der Mucosa abzusprossen. Bei einem der primitivsten Vertebraten, dem Schleimaal (*Myxine glutinosa*), tritt das erste Inselorgan auf. Dieses Inselorgan hat sich in der Mucosa des Gallenganges angesiedelt. Das Inselparenchym weist Insulin- und Somatostatinzellen im Verhältnis von 100:1 auf. Die Insulinzellen sind vollständig, die Somatostatinzellen sind nur unvollständig aus der Darmmucosa emigriert. Im Inselorgan finden sich neben den Zellen offenen Typs auch Insulinzellen geschlossenen Typs (Abb. 5). Der überwiegende Teil der Insulinzellen hat jedoch nach dem Durchtritt durch die Basallamina Zellnester gebildet. In diese Zellnester eingebettet liegen einige Somatostatinzellen [47]. Glucagon- und PP-Zellen verbleiben vollständig als Zellen offenen Typs in der Darmmucosa. Über eine weitere Zwischenstufe bei den niederen Knorpelfischen (Seedrachen: Holocephali) [48] bildet sich die Langerhans'sche Insel bei den höheren Knorpelfischen (Elasmobranchier, z.B. Haie und Rochen) vollständig aus. Es liegt ein endokrines Pankreas vor. In ihm bilden alle vier Inselzelltypen die Langerhans'schen Inseln, die stets direkt dem *Ductus pancreaticus* anliegen. Glucagon-, Somatostatin- und PP-Zellen zeigen eine duale Verteilung in der Darmmucosa und in der Langerhans'schen Insel.

Abb. 5: Typen Inselhormon-produzierender Zellen. Im Laufe der Evolution treten drei verschiedene Typen von Inselhormon-produzierenden Zellen auf: Zellen offenen sowie geschlossenen Typs und Langerhans'sche Inseln - Nester aus Zellen geschlossenen Typs.



- | | |
|---|------------------------------------|
| □ | Epithelzelle |
| a | endokrine Zelle offenen Typs |
| b | endokrine Zelle geschlossenen Typs |
| c | Langerhans'sche Insel |

In der Entwicklung von den Knorpelfischen (Chondrichthyes) über die Knochenfische (Osteichthyes), Amphibien zu den Reptilien und letztendlich zu den Vögeln (Aves) und Säugetieren (Mammalia) folgt die Evolution den bisher abgezeichneten Tendenzen. Das Pankreas der Säugetiere wird zu einer kompakten Drüse und gliedert sich makroskopisch in typischer Weise. Es besteht aus einem endokrinen und einem exokrinen Teil. Die Langerhans'schen Inseln - Bausteine des endokrinen Pankreas - liegen verstreut auch im exokrinen Teil vor. Einzelzellen aller vier Inselzelltypen - am wenigsten der Insulinzellen - liegen auch in der intestinalen Mucosa vor [49].

2.5.2. Morphologie und Physiologie der Langerhans'schen Insel

Langerhans'sche Inseln stellen den endokrinen Teil des Pankreas dar. Es handelt sich um Zellnester im exokrinen Pankreas. Beim Menschen schätzt man ihre Anzahl auf 1- 2 Millionen. Diese machen ca. 1,5 % des Gesamtvolumens des Pankreas aus. Die Gesamtmasse der Inseln wird mit 1 g bemessen, ihr durchschnittlicher Durchmesser beträgt 100 bis 225 μm [50]. Sie bestehen im wesentlichen aus vier verschiedenen Zelltypen: den α -, den β -, den δ - und den PP-Zellen. Die α -Zellen stellen ca. 20 % der Inselzellen. Sie liegen gewöhnlich an der Inselperipherie. Die β -Zellen stellen ca. 60-80 % der Inselzellen und liegen in der Mitte der Inseln. Gegenteilige Befunde liegen beispielsweise beim Pferd vor, wo die β -Zellen einen Mantel um die α -Zellen bilden [51]. δ -Zellen kommen in geringer Anzahl (5-8 %) verstreut über die Insel vor. Die PP-Zellen stellen in den Inseln der dorsalen Pankreaslage nur ca. 1-3 % der endokrinen Zellen. In den mäanderförmigen Inseln des ventralen Pankreas hingegen bilden sie über 50 % der Inseln [52]. Viele Inseln liegen auch einzeln zwischen den Gangzellen des exokrinen Pankreas.

Jeder Zelltyp sezerniert ein für ihn typisches Inselhormon:

a-Zellen:	Glucagon
b-Zellen:	Insulin
d-Zellen:	Somatostatin
PP-Zellen:	Pankreatisches Polypeptid

Glucagon ist ein aus 29 AS bestehendes Peptidhormon. Seine Freisetzung bewirkt eine Erhöhung der Glykolyserate in der Leber. Desweiteren steigert es die Glukoneogenese und vermindert die Glukoseoxidation. Somit steigert Glucagon den Blutglukosespiegel. Diese Wirkung charakterisiert Glucagon als Insulin-Antagonisten.

Somatostatin wird im zentralen Nervensystem (ZNS) und im Pankreas gebildet und wird ins Blut sowie ins Darmlumen abgegeben. Neben Funktionen als Neurotransmitter erfüllt es Aufgaben im gastrointestinalen Trakt. Durch Somatostatin wird die Sekretion sämtlicher Enterohormone gehemmt. Dies umfaßt Gastrin, Cholezystokinin (CCK), Sekretin, Vasoactives Intestinales Polypeptid (VIP), Gastrisch-Inhibitorisches Peptid (GIP), Motilin und Pankreatisches Polypeptid (PP). Ebenso werden Magensäureproduktion, Magenentleerung, Darmmotilität sowie Resorption und Blutfluß im Splanchnikusgebiet vermindert. Neben dem exokrinen Pankreas werden auch die endokrinen Zellen beeinflusst. Die Freisetzung von Insulin und Glucagon wird durch Somatostatin gehemmt [53].

Das **Pankreatische Polypeptid** ist der pankreatische Vertreter der Neuropeptide Y (NPY)-Familie. Sein Rezeptor ist der NPY-Rezeptor [54]. In Nagetieren wurde ausserdem ein spezifischer Rezeptor der NPY-Rezeptorfamilie beschrieben [55]. Seine physiologische Bedeutung ist in der Regulation der Nahrungsaufnahme zu suchen [56]. An das pankreatische Polypeptid überexprimierenden Mäusen konnte eine verminderte Nahrungsaufnahme und daraus resultierend ein reduziertes Körpergewicht festgestellt werden [57].

Die physiologisch bedeutsamste Funktion **Insulins** ist die Senkung des Blutglukosespiegels. Eine detaillierte Darstellung des Wirkungsspektrums und affektierte Organe findet sich im Kapitel „2.7. Physiologische Bedeutung von Insulin“.

2.6. Das Peptidhormon Insulin

Insulin wurde erstmals 1922 von Banting u. Best isoliert und charakterisiert [58]. Bereits 1889 konnten v. Mehring und Minikowski durch Pankreasektomie bei Hunden eine Zuckerharnruhr hervorrufen. 1955 gelang Sanger die Strukturaufklärung von Insulin. Die Synthese gelang 1963 den Arbeitsgruppen um Zahn [59]. Insulin war damit das erste synthetisierte humane Peptidhormon [60, 61]. Strukturell setzt sich Insulin aus zwei Untereinheiten zusammen: der A- (21 AS) und B-Kette (30 AS). Die beiden Ketten sind durch 2 Disulfidbrücken miteinander verbunden (interchenare Disulfidbrücken). Eine dritte Disulfidbrücke bildet die A-Kette aus (intrachenare Disulfidbrücke) (Abb. 6).

Aufgrund der speziellen Struktur der nicht kovalent verbundenen Ketten stellt sich die Synthese von Insulin problematisch dar. Seit der Entdeckung von Proinsulin durch Steiner [62] weiß man, daß bei der Insulinbiosynthese ein zweckmäßiger Umweg bestritten wird. Im Proinsulin, der Vorstufe des Insulins, sind die A- und B-Kette durch das C-Peptid (*connecting peptide*) verbunden [63], so daß eine Struktur in Form einer Spirale vorliegt (Abb. 6). Erst in den Exkretionsgranula wird das Proinsulin zu Insulin und C-Peptid umgesetzt [64] und zwei lineare Ketten entstehen durch die Abspaltung des C-Peptides. Insulin und C-Peptid werden dementsprechend äquimolar freigesetzt [65].

Untersuchungen auf RNA-Ebene ergaben, daß Proinsulin selbst aus einer Vorstufe, dem Präproinsulin, entsteht [66]. Proinsulin entsteht durch Abspaltung eines 23 AS langen Polypeptids vom N-Terminus des Präproinsulins [67] (Abb. 6). Die Umwandlung des Insulins aus den Vorformen vollzieht sich sehr schnell auf dem Weg vom Bildungsort (dem rauhen ER) zur Zytoplasmamembran [68]. Bei entsprechender Stimulation wird das Insulin durch Exozytose durch die Zytoplasmamembran transportiert und freigesetzt. Dies geschieht durch Fusion der das Insulin umgebenden Membranballons mit der Zytoplasmamembran [69]. Unter

günstigen Bedingungen sind die Stomata der Exozytosebläschen in der Zytoplasmamembran, die beim Sekretionsvorgang entstehen, elektronenmikroskopisch nachweisbar [70].

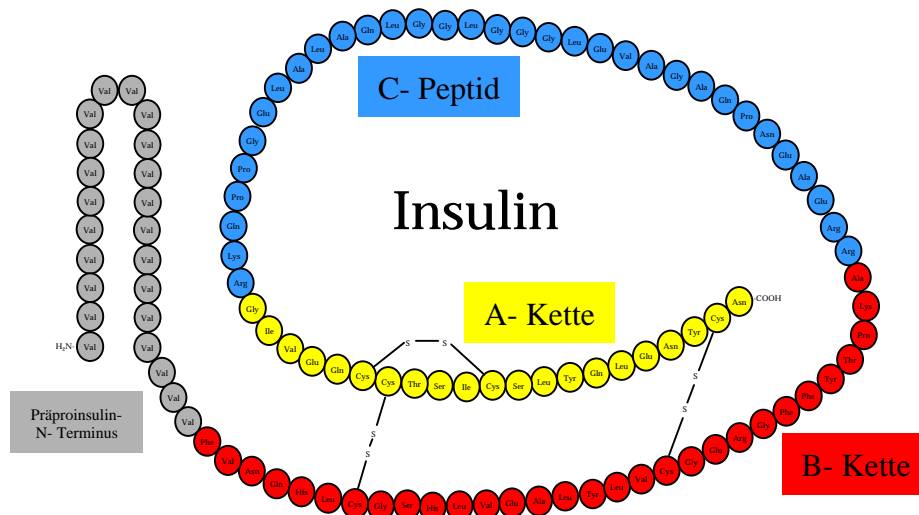


Abb. 6: Primärstruktur von Präproinsulin. Bei der Prozessierung zum Insulin werden nacheinander der N-Terminus (grau dargestellt) und das C-Peptid (blau dargestellt) abgespalten.

2.7. Physiologische Bedeutung von Insulin

Der physiologisch bedeutsamste Reiz der Insulinfreisetzung ist die Erhöhung des Glukosespiegels im Blut [71]. Der basale Blutglukosespiegel liegt bei ca. 5 mM (90 mg/l). In Folge von Nahrungsaufnahme steigt der Blutglukosespiegel auf Werte um 15 mM (270 mg/l). Zwischen diesen Konzentrationen reagiert die β -Zelle auf kleinste Konzentrationsänderungen mit der Anpassung ihrer Insulinfreisetzung. Bei 5 mM Glukose im Blut kommt es lediglich zu einer basalen Insulinfreisetzung [72]. Bei einem längerfristig erhöhten Blutglukosespiegel, z.B. in Folge von Nahrungsaufnahme, kommt es zu einer biphasischen Insulinfreisetzung. Zunächst findet eine rasche initiale Insulinfreisetzung statt. Im weiteren Verlauf kommt es nach abruptem Abbruch der initialen Freisetzung zu einem kontinuierlichen Anstieg der Freisetzungsrates [72]. Dieses Muster der Insulinfreisetzung führte zu der Hypothese, daß die primäre Antwort von Insulingranula ausgelöst wird, die nahe der

Zytoplasmamembran deponiert sind. Nach Erschöpfung dieses Speichers werden auch Granula mobilisiert, die weiter im Zellinneren liegen.

2.8. Bekannte Mechanismen der Insulinfreisetzung

Die Freisetzung Insulins aus pankreatischen β -Zellen erfolgt als Reaktion auf eine Vielzahl von Stimuli. Die Liste der stimulierenden Substanzen reicht von Neurotransmittern und Neuropeptiden über zirkulierende Peptide und Aminosäuren bis hin zur Glukose, dem physiologisch relevantesten Stimulus. Angesichts der Vielseitigkeit dieser Signalsubstanzen gestaltet es sich schwer, eine klare Trennung der vorliegenden Signaltransduktionskaskaden in der β -Zelle vorzunehmen. Jüngere Fortschritte auf dem Gebiet des „*stimulus response coupling*“ ermöglichen jedoch ein komplexeres Verständnis der β -Zellfunktion bis hin zur Dysfunktion, d.h. der Manifestation von Krankheiten.

Die Reaktion der β -Zelle auf Glukose ist aufgrund der großen physiologischen Bedeutung dieses Systems am intensivsten erforscht. In Konzentrationen, die zur Insulinfreisetzung führen, wurde eine Anzahl weiterer Effekte auf die β -Zelle festgestellt. Diese veranlassen die initiale und die zweite Phase der biphasischen Insulinfreisetzung [73]. Die ersten intensiven Untersuchungen auf dem Gebiet der Insulinfreisetzung wurden in den späten 60-er Jahren von Dean und Matthews durchgeführt. Sie publizierten 1968 Ergebnisse der ersten Messungen des Membranpotentials an β -Zellen [74]. In Folge der Applikation bekannter insulinotropher Substanzen konnten sie eine Membrandepolarisation und die damit zusammenhängende Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen detektieren [75]. In diesen Experimenten wurden Mikroelektroden in β -Zellen kompletter Langerhans'scher Inseln eingeführt. Während der Stimulation mit Glukose kam es zu einer immer gleichen Antwort bestehend aus: Depolarisation, einer anschließenden Plateau-Phase mit enormen Aktionspotentialen, gefolgt von einer Repolarisation der Zelle. Aus diesen frühen Studien ging weiterhin hervor, daß zum Erhalt dieser Antwort Glukose metabolisiert werden muß und daß die Insulinfreisetzung abhängig von einem von Ca^{++} - Einstrom in die β -Zelle ist [76, 77]. Nachdem durch Verwendung konventioneller Mikroelektroden die makroskopisch-

elektrische Antwort der β -Zelle auf Glukosegabe charakterisiert werden konnte, eröffnete die gerade entwickelte „Patch-Clamp“-Technik [78] neue Möglichkeiten. Es wurde möglich, die elektrische Gesamtantwort der Zelle (das Membranpotential) als Summe der Einzelströme (der einzelnen Ionenkanalaktivitäten) zu betrachten. Ionenkanäle sind membrangebundene Proteine, die durch spezifische Permeabilität für Ionen als selektive Ionen-„Tunnel“ dienen. Der Austausch von K^+ , Na^+ , Cl^- und vor allem Ca^{++} über die inneren Membranen und die Zytoplasmamembran sind der Schlüssel zum Verständnis, wie Glukose die Vielzahl seiner elektrophysiologischen Effekte erzielen kann. Bei der „Patch-Clamp“-Technik wird eine Mikropipette (Durchmesser der Spitze $< 1 \mu m$) auf die Zellmembran aufgesetzt. So können zur Referenzelektrode Ströme von 10^{-12} A und deren Änderungen in Echtzeit (Millisekunden) gemessen werden. 1984 gab es zwei Veröffentlichungen von herausragender Bedeutung für die β -Zellforschung. Es wurde der ATP-abhängige Kaliumkanal (K_{ATP} -Kanal) in der β -Zelle detektiert [79] und seine regulatorische Bedeutung für das Membranpotential dieses Zelltypes charakterisiert [80]. Anschließende Arbeiten zeigten, daß der K_{ATP} -Kanal durch die intrazellulären Konzentrationen von ADP und ATP reguliert wird [81, 82]. Als Interpretation dieser Ergebnisse entstand das Modell der K_{ATP} -Kanal-abhängigen Signaltransduktionskette der Insulinfreisetzung. Heute ist es ein allgemein akzeptiertes Modell, daß unter physiologischen Bedingungen das Membranpotential von der $Na^+-K^+-ATPase$ moduliert und die passive K^+ -Fluktuation durch den geöffneten K_{ATP} -Kanal kompensiert wird. Nach Aufnahme von Glukose kommt es durch den Glukose-„Sensor“ Glukokinase wie auch mitochondriale Effekte zu einer Verschiebung des Verhältnisses von ATP/ADP zugunsten des Triphosphates. Dadurch kommt es zu einer Schließung des K_{ATP} -Kanals und nachfolgend zur Membrandepolarisation. Bei Erreichen eines Membranpotentials von -40 mV öffnet sich der spannungsabhängige Kalziumkanal (Ca_v). Der schnelle Kalziumeinstrom entlang des 10.000-fachen Konzentrationsgradienten führt zu einem unmittelbaren Anstieg der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration entlang der Zellmembran [83]. Diese erhöhte Kalziumkonzentration führt über die Exozytose zur Insulinfreisetzung. Somit hat der K_{ATP} -Kanal regulatorische Bedeutung für die Insulinfreisetzung, aus

der sich auch eine klinische Bedeutung ableitet. Der K_{ATP} -Kanal wird durch Sulfonylharnstoffe (z.B. Glibenclamid, Tolbutamid) inhibiert. Dadurch wird der Glukose-Effekt „improvisiert“ und es kommt zu einer Insulinfreisetzung [84]. Bei Typ II Diabetes liegt eine Unterbrechung des „*stimulus response coupling*“ vor. Durch Ersetzen des physiologischen Stimulus Glukose durch Sulfonylharnstoffe kann die erstrebte Antwort auf direktem Wege erzielt werden. Im umgekehrten Fall können K_{ATP} -Kanal-Öffner, wie z.B. Diazoxid, die ATP-induzierte Schließung verhindern und so eine verstärkte Insulinsekretion unterbinden [85]. Diazoxid findet bei der Behandlung von Hyperinsulinismus Anwendung. Eine direkte Inhibition des spannungsabhängigen Kalziumkanals hat ähnliche Effekte auf die Insulinfreisetzung [86].

In β -Zellen - wie auch in allen anderen Zellen - ist die beschriebene Kalziumaufnahme über die Zytoplasmamembran nur eine der zahlreichen Kalziumtranslokationen. Aufgrund dessen, daß Kalzium ein obligatorischer Signalübermittler in der β -Zelle ist, wird die zytoplasmatische Kalziumkonzentration extrem niedrig gehalten. Dies geschieht über Kalziumausschüttung in den extrazellulären Raum, also über die Zytoplasmamembran, durch aktiven Transport in Kalzium-speichernde Zellorganellen durch die Kalzium-ATPase und ins ER, ebenfalls durch die Kalzium-ATPase. Die Aktivität dieser Pumpen ist sehr genau mit den Mechanismen koordiniert, die zum Kalzium-Einstrom durch die spannungsabhängigen Kalziumkanäle der Zytoplasmamembran und aus intrazellulären Speichern (hauptsächlich durch IP_3 -Rezeptor-Kalziumkanäle) führen. Zusätzlich haben β -Zellen einen Mechanismus entwickelt, der ihnen hilft intrazelluläre Kalziumspeicher bei lang anhaltender Stimulation wieder aufzufüllen. Dies geschieht durch "kapazitative Kalzium-Einwärtsgleichrichter". Dadurch ist die zytosolische Kalziumhomöostase ein höchst integrierter, dynamischer Prozeß [86, 87]. Natürlich hängt sie so auch von einer Vielfalt von Faktoren ab. Aus diesem Grunde ist es nicht verwunderlich, daß zu starke ungeeignete Stimuli, die zu unkontrollierten Kalziumerhöhungen im Zytosol führen, eine Apoptose einleiten [88]. Störungen der Kalziumhomöostase wurden als maßgebliche Faktoren für Diabetes im Tiermodell [89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98] sowie an humanen β -

Zellen [99, 100, 101, 102, 103] beschrieben. Ebenso kann es durch eine gestörte Kalziumhomöostase zu Hyperinsulinismus kommen. Dies wurde ebenfalls im Tiermodell [104, 105] und beim Menschen gezeigt [106, 107].

Die Regulation der Insulinfreisetzung findet in der ersten Phase durch den Glukosemetabolismus - gekoppelt mit dem K_{ATP} -Kanal - statt. Durch Aktivierung der Kaskade müssen Sekretgranula zur Zytoplasmamembran transportiert werden. Granulae, die sich schon in direkter Nachbarschaft der Zellmembran befinden, können sofort exozytiert werden. Granulae, die eine größere Entfernung zurückzulegen haben, müssen hingegen kontrolliert transportiert werden. Dieser Transport und der letzte Schritt - das Andocken und die finale Fusion mit der Zytoplasmamembran genau wie die Rückführung von Membranpartikeln über Endozytose sind sehr komplexe Prozesse. Die endgültige Freisetzung von Insulin involviert viele Komponenten und beschreitet viele Seitenwege. Diese sind in der "SNAP receptor hypothesis" zusammengefaßt [108].

Ein weiterer bedeutsamer Weg der glukoseabhängigen Insulinfreisetzung ist der " K_{ATP} -Kanal-unabhängige Signaltransduktionsweg" [109]. Dieser Weg führt zu einer Verstärkung der Insulinsekretion bei erhöhten zytosolischen Kalziumkonzentrationen, d.h. nach Aktivierung des K_{ATP} -Kanal über den " K_{ATP} -Kanal-abhängigen Signaltransduktionsweg". Experimentell konnte diese Signaltransduktionskaskade in humanen [110, 111] und in β -Zellen von Nagetieren [112, 113, 114] nachgewiesen werden. Nach Depolarisation der Zytoplasmamembran durch KCl und Blockierung des K_{ATP} -Kanal-Mechanismus durch den Öffner Diazoxid oder den Schließer Sulfonylharnstoff ist eine dosisabhängige Insulinfreisetzung durch Glukose möglich. Dieser Mechanismus ist weitgehend für die zweite Phase der Insulinfreisetzung verantwortlich. Auf molekularer Ebene ist dieser Vorgang noch nicht vollständig verstanden. Als sicher gilt, daß zur Insulinfreisetzung durch den K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Mechanismus Glukose metabolisiert werden und der zytosolische Kalziumspiegel gestiegen sein muß [109]. Von Yajima wurde jedoch gezeigt, daß durch Glukose auch unabhängig vom K_{ATP} -Kanal und erhöhten zytosolischen Kalziumkonzentrationen Insulin freigesetzt werden kann [115]. Diesem Mechanismus liegt eine Signaltransduktion über die Proteinkinasen A und C zugrunde. Diese Insulinfreisetzung, die man im

Mechanismus schon von der Wirkung von Hormonen, Neuropeptiden und Neurotransmittern kennt, ist GTP- und ATP-abhängig.

2.9. Nachweis von Guanylin und GC-C in der Langerhans'schen Insel

1997 konnte sowohl Guanylin wie auch GC-C in einer Zusammenarbeit des IPF mit dem Anatomischen Institut der Universität Zürich-Irchel durch Reinecke et al. in der Langerhans'schen Insel der Ratte immunhistochemisch nachgewiesen werden (unpublizierte Daten) (

Abb. 7). Wie aus genaueren Untersuchungen hervorging, ist die GC-C hierbei in α - und in β -Zellen vertreten. Dies geht aus einer gezeigten Kolo-kalisation mit Glucagon und Insulin hervor.

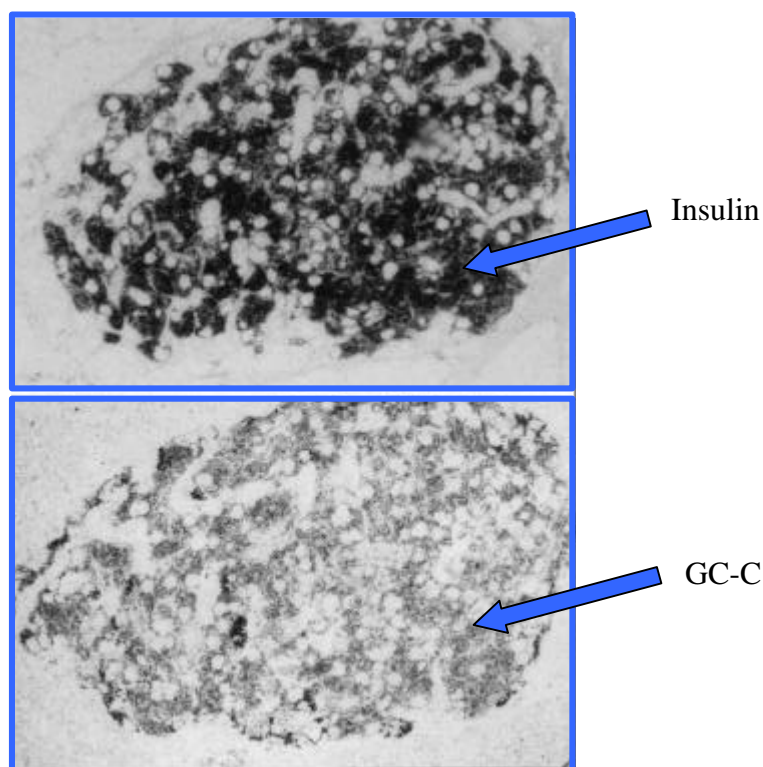


Abb. 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen zweier Folgeschnitte einer Langerhans'schen Insel einer Maus. Die Pfeile zeigen Bereiche deutlicher GC-C- bzw. Insulin-Immunreaktivität.

Guanylin hingegen wird in der β -Zelle nicht exprimiert. Der Synthesort in der Langerhans'schen Insel ist in den α -Zellen. Dort kommt es in Kolokalisation mit Glucagon in den Sekretgranula vor (Abb 8). Der Nachweis der GC-C und Guanylins in der Langerhans'schen Insel stellen die Basis der vorliegenden Arbeit dar. Die physiologischen Effekte eines postulierten parakrinen Mechanismus und der intrazelluläre Wirkmechanismus der GC-C in der β -Zelle sollten charakterisiert werden.

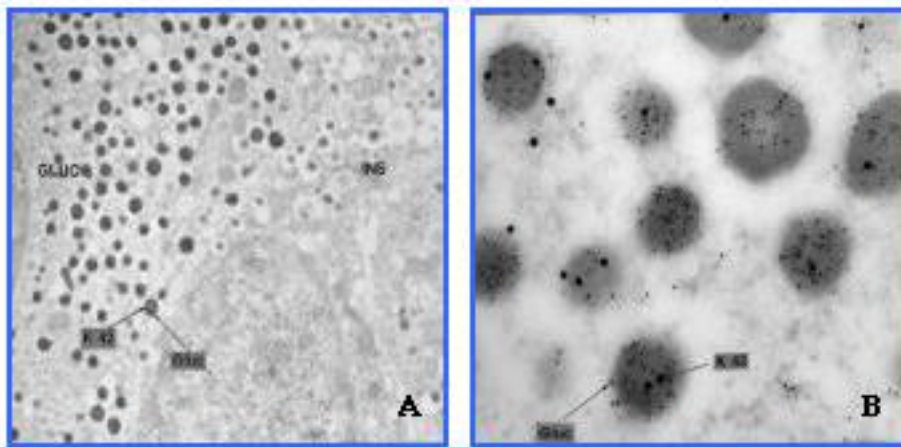


Abb 8: Ausschnitte aus Elektronenmikroskopischen Aufnahmen einer Langerhans'schen Insel einer Maus. In Abb. A sind eine α -Zelle (GLUC) und eine β -Zelle (INS) dargestellt. Guanylin (K42) und Glucagon (Gluc) liegen kolokalisiert in der α -Zelle vor. In der β -Zelle ist kein Guanylin nachweisbar. In Abb. B sieht man die Sekretgranula einer α -Zelle. Guanylin und Glucagon liegen in denselben Granula vor.

2.10. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Funktion der GC-C in der pankreatischen β -Zelle. Im Vorfeld wurde die GC-C immunhistochemisch in β -Zellen nachgewiesen. Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis, ob die GC-C einen Einfluß auf die Insulinsekretion von β -Zellen hat. Dieser Effekt sollte an der pankreatischen β -Zelllinie INS-1 und an isolierten Langerhans'schen Inseln aus Ratten nachgewiesen werden. Für den Fall eines nachweislichen Einflusses der GC-C auf das insulinfreisetzende System bestand im weiteren Verlauf die Aufgabe, die einzelnen Schritte der Signaltransduktion zu klären. Hierzu sollten Inkubations- bzw. Perifusionsversuche mit verschiedenen spezifischen Inhibitoren und Aktivatoren durchgeführt werden. Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war also:

Was geschieht nach der Aktivierung der GC-C in der β -Zelle bis Insulin freigesetzt wird?

Desweiteren sollte der Phänotyp der GC-C-knock-out-Mäuse charakterisiert werden. Mit Hilfe von Tierversuchen in Stoffwechselfäfigen und Glukosetoleranztests sollten die Auswirkungen des Fehlens der GC-C im lebenden Organismus am Tiermodell analysiert werden.

3. Material & Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte und Apparaturen

Wenn nicht explizit erwähnt, kamen für alle Arbeiten Einwegplastikmaterialien (z.B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) und Glasmaterialien (z.B. Meßzylinder, Duran-Flaschen) zum Einsatz. Zusätzlich zu den laborüblichen Standardgerätschaften wie Pipetten, Magnetrührer, Thermomixer etc. wurden folgende Geräte verwendet:

Bildbearbeitung: -'Gel Doc 2000'-System und QuantityOne[®] 4.0.1 Software der Firma Bio-Rad

DNA-Gelelektrophorese: -'Mini-Sub[™] Cell' der Firma Bio-Rad -'Wide Mini-Sub[™] Cell' der Firma Bio-Rad

ELISA-Reader: -'Mikroplate Autoreader EL 311' der Firma BIO-TEK Instruments
- 'MR 5000' der Firma Dynatech

Inkubationsschrank: -'B 6120' der Firma Heraeus, Hanau

Küvettschleuder: -'KS 8 CE' der Firma Innovative-Technische-Systeme Th. Betzel, Hattersheim

pH-Meter: -'CG 804' der Firma Schott
- 'CG 840' der Firma Schott

Proteingelelektrophorese: -'Mini-Protean III Elektrophoresezellen' der Firma Bio-Rad

Sterilisation: -'Bioclav 3.021001' der Firma Schütt Labortechnik, Göttingen

Spektralphotometer: -'DU[®]640' der Firma Beckman inklusive:

- wassertemperierbaren 6-fach Küvettenhalter und Software-Paket

- 'MultiTempII'-Thermostat der Firma Pharmacia

- Thermocycler: - 'GeneAmp PCR System 2400' der Firma Perkin Elmer
- Ultraschallgerät: - 'Vibra cell' der Firma SONIC & MATERIALS
- Waagen: - Laborwaage 'LC 2200 S' der Firma Sartorius, Göttingen
- Analytikwaage 'AC 120 S' der Firma Sartorius, Göttingen
- Feinwaage 'supermicro' der Firma Sartorius, Göttingen
- Zellkulturbrutschrank: - 'IG 150' der Firma Jouan
- Zentrifugen: - Kühlzentrifuge 'Mikro Rapid/K' der Firma Hettich, Henningen
- Kühlzentrifuge 'Sorvall[®] RT 6000B' der Firma Du Pont
- Kühlzentrifuge 'Biofuge 28 RS' der Firma Heraeus, Hanau
- Kühlzentrifuge 'Rotixa/RP' der Firma Hettich, Henningen
- Vakuum-Zentrifuge 'Univapo 150H' der Firma Vacuumbrad GmbH & Co

3.1.2. Enzyme und Reagentsätze (Kits)

Wenn nicht explizit erwähnt, kamen für die entsprechenden Anwendungen, die im folgenden aufgelisteten, kommerziell erhältlichen, Kits zum Einsatz.

- RNA-Isolierung: RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen
- Isolierung genomischer DNA: QIAamp DNA Blood Mini-Kit von Qiagen
- *TaqMan*[™]-Experimente: *TaqMan*[®] Universal PCR MasterMix der Firma Perkin Elmer

3.1.2.1. DNA-modifizierende Enzyme und Proteinasen

Für gentechnische und proteinchemische Arbeiten wurden die unten aufgeführten Enzyme und die entsprechenden Puffer von den angegebenen Firmen bezogen.

- Reverse Transkriptase: SUPERScript[™] II RT von GibcoBRL
- Proteinase K: von QIAGEN
- Taq Polymerase: von Perkin Elmer und von QIAGEN

3.1.3. Antikörper

	Beschreibung / Epitop	Spezies	Endverdünnung	Quelle
GPx Insulin	Insulinantikörper Sekundärer AK	Meerschweinchen	1:100.000	DAKO
α -guinea pig-IgG	Anti Meerschweinantikörper Primärer Antikörper	Ziege	1:1.000	ICN
Anti PKG I	Anti Proteinkinase G I AK (ganzes Molekül)	Kaninchen	1:1.000	Stressgen Inc. Canada
Anti PKG I (CT)	Anti Proteinkinase G I AK (C-Terminus)	Kaninchen	1:3.000	Stressgen Inc. Canada
Anti GC-C	Anti Guanylatzyklase C	Kaninchen	1:1.000	IPF
	Anti Guanylin (C-Terminus)	Kaninchen		IPF
	Anti Guanylin (N-Terminus)	Kaninchen		IPF

3.1.4. Lösungen und Puffer

Physiologischer Puffer nach Krebs-Ringer

Krebs 1:	NaCl	38,3 g
	KCl	1,79 g
	CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,96 g
	Hepes	29,79 g

add 1 Liter mit bidest.

Krebs 2:	KH ₂ PO ₄	0,82 g
----------	---------------------------------	--------

add 1 Liter mit bidest.

Krebs 3:	MgSO ₄ * 7H ₂ O	1,48 g
----------	---------------------------------------	--------

add 1 Liter mit bidest

Krebs-Ringer-Hepes-Puffer:	20 %	Krebs 1
	20 %	Krebs 2
	20 %	Krebs 3
	40 %	bidest.

pH mit NaOH bzw. HCl auf 7,4 einstellen

3.2. Arbeiten auf RNA/DNA-Ebene

3.2.1. Arbeiten mit RNA

Bei allen Arbeitsvorgängen mit RNA wurden zur Vermeidung von Kontaminationen (RN-ase-Gefahr) Handschuhe getragen und sterile gestopfte Pipettenspitzen verwendet. RNA-Proben sind immer in sterilem bidestilliertem Wasser gelöst und bei -80°C aufbewahrt worden.

PCR: Polymerase-Kettenreaktion [116]

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) kam zur selektiven Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen zum Einsatz. Zu diesem Zwecke wurden verschiedene Templates und Oligonukleotide (Primer) verwendet. Für die jeweiligen Anforderungen fanden speziell modifizierte PCR-Methoden Verwendung.

3.2.2. Standard PCR

Diese Methode wurde hauptsächlich eingesetzt, um den Genotyp der gezüchteten Mäuse der GC-C-knock-out-Linien zu bestimmen.

Allgemeiner PCR-Reaktionsansatz

10 %	PCR-Reaktionspuffer (von InViTeck bzw. von QIAGEN)
2 %	dNTP-Mix (Endkonzentration: 0,2 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
2 %	je Primer (Endkonzentration: ca. 0,2 µM je Primer)
2 %	Template (50-400 ng DNA, lysierte Zellen bei Kolonie-PCR bzw. cDNA bei RT-PCR)
0,5-2,0 M	MgCl ₂
1 U	DNA-Polymerase
Auffüllen auf 100 % mit bidest. Wasser von Sigma	

Allgemeiner PCR-Reaktionsablauf

Die PCR wurde im 'GeneAmp PCR System 2400' der Firma Perkin Elmer nach folgendem Grundschemata durchgeführt:

1.	Erst- Denaturierung der DNA	94°C	4 min
2.	Denaturierung	94°C	15 sek
3.	Primeranlagerung	58; 61°C	15 sek
4.	Elongation	72°C	30 sek
5.	End-Elongation	72°C	4 min
6.	Kühlen	4°C	∞

Die Temperatur zur Primeranlagerung wurde für das jeweilige Primerpaar möglichst hoch gewählt, um spezifische Amplifikate zu erhalten. Die Länge der Elongation bei 72°C richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes (Richtwert: 1000 B/min). Es wurden im Standardfall 40 Reaktionszyklen (2. - 4. Schritt) durchgeführt. Die Länge der Denaturierungs- und Primeranlagerungszeit hatte keinen entscheidenden Einfluß auf das Ergebnis der durchgeführten PCR.

3.2.3. Real-time *TaqMan*TM PCR

Die *TaqMan*TM PCR stellt eine hochspezifische und sehr sensitive Methode in der DNA-Analytik dar. Im Rahmen der Arbeit wurde mittels dieser Methode eine quantitative Bestimmung der Expressionsrate von Insulin in unterschiedlich stimulierten INS-1-Zellen erstellt.

Die sogenannte *TaqMan*TM PCR basiert auf dem ursprünglichen 5'-Nuklease-Assay von HOLLAND (1991) [117] und macht sich die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq* DNA-Polymerase (*AmpliTaq* DNA-Polymerase, ABI) zu Nutze. Im Gegensatz zu einer Standard-PCR wird zusätzlich zu dem Primerpaar eine fluorogene Sonde (in *sense* Orientierung) verwendet, welche mit der DNA-Zielsequenz zwischen den beiden Primern hybridisiert. Diese Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff (Fluoreszeinderivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencherfarbstoff (Rhodaminderivat) trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist. Wenn bei einer spezifischen Wellenlänge ($\lambda = 488 \text{ nm}$) die intakte Sonde zur Fluoreszenz angeregt wird, so wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern an den Matrizen-DNA-Strang. In der Extensionsphase trifft die *Taq* DNA-Polymerase auf die Sonde und beginnt diese von der Matrize zu verdrängen. Dadurch entsteht eine „Y“-förmige Sekundärstruktur, die die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase aktiviert und die Sonde spaltet. Frei vorliegende Sonden, welche nicht hybridisieren bzw. nicht verdrängt werden, können hingegen nicht gespalten werden. Kommt es zur Hydrolyse der Sonde, so wird die räumliche Nähe und auch der FET zwischen Reporter- und Quencherfarbstoff aufgehoben. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal ist sehr sequenzspezifisch. Die Veränderung der Fluoreszenz wurde mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß erfaßt.

Primer- und Sondensequenzen wurden mit dem Programm Primer ExpressTM (Perkin Elmer) erstellt und von der Firma Perkin Elmer bezogen. Als endogener Standard

kamen Primer und Sonde für das Haushaltsgen („Housekeeping Gen“) Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) zum Einsatz [118]. Primer und Sonden wurden jeweils in einer Endkonzentration von 300 nM eingesetzt. Als Reporterfarbstoff für die GAPDH-Sonde diente 6-Carboxy-Fluorescein (FAM). Alle weiterhin notwendigen PCR-Komponenten enthielt der verwendete 2 x *TaqMan*[®] Universal PCR MasterMix (ABI). Zur relativen Quantifizierung wurde eine Standardkurve mit einer Probe von bekannter Konzentration erstellt (Standardkurvenmethode nach SCHILD). Alle Mengen an spezifischen Produkten wurden dann auf die Menge an GAPDH bezogen.

3.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde ein Aliquot der zu bestimmenden Probe mit Nukeinsäuren bekannter Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen und im Vergleich der Bandenintensität die Probenkonzentration abgeschätzt. Zur genauen Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen in wäßrigen Lösungen wurden die Proben entsprechend mit bidest. Wasser verdünnt (z.B. 1:50) und die optische Dichte bei 260 nm in einer Quartzküvette mit 1 cm Schichtdicke gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte über die Gleichung:

$$c[\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} * \epsilon * V$$

V = Verdünnungsfaktor

c = Konzentration in ng/μl

OD₂₆₀ = Wert der optischen Dichte bei der Wellenlänge von 260 nm

ε = Extinktionskoeffizient:

- einzelsträngige RNA: ε = 40
- doppelsträngige DNA: ε = 50
- einzelsträngige DNA: ε = 37
- einzelsträngige Oligos: ε = 20

Um einen Anhaltspunkt über die Reinheit der Nukleinsäure zu erhalten, wurde zusätzlich die optische Dichte bei 280 nm bestimmt. Der Quotient von OD_{260}/OD_{280} gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der Probe. Dieser Wert sollte bei einer proteinfreien Nukleinsäurelösung zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.2.5. Reverse Transkription

Zum Nachweis von RNA-Fragmenten in Real-time *TaqMan*[™] PCR mußte die benötigte RNA in cDNA revers umgeschrieben werden. Dies geschah unter Verwendung der SUPERSRIPT[™] II von GibcoBRL.

Für einen 20 µl Reaktionsansatz wurden 5 µg RNA und 12 pmol (dT)-Primer Unip 2 in 12 µl sterilem bidest. Wasser gelöst und 10 min bei 72°C denaturiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz sofort auf Eis abgekühlt und kurz in der Tischzentrifuge anzentifugiert. Nach der Zugabe von 4 µl 5 x First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT) und 1 µl 10 mM dNTP Mix wurde die Mischung mit der Pipettenspitze gemischt und für 2 min bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der Reversen Transkriptase (1 µl SUPERSRIPT[™] II) und eine Inkubation bei 42°C für 50 min. Abschließend kam es durch Erhitzen (70°C; 15 min) zum Abbruch der Reaktion. Zur Verwendung der so erhaltenen cDNA als Template für die PCR wurde der Reaktionsansatz vorher 1 : 10 mit Bidest verdünnt.

3.2.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Der elektrophoretische Nachweis der DNA erfolgte nach dem jeweiligen Trennungsziel durch Auftrennung in 0,8-1,5%igen (w/v) horizontalen Agarosegelen, welche zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Bestrahlung Ethidiumbromid ($\cong 0,10 - 0,15 \mu\text{g/ml}$) enthielten. Es wurden Mini-Gele (90 x 78 x 6 mm, 50 ml, bei 80 Volt) und Midi-Gele (143 x 138 x 5 mm, 100 ml, bei 120 Volt) verwendet. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit 0,1 - 0,2 Volumen 10 x DNA-Blaumarker vermischt. Bei dem für das Gel benötigten Puffer als auch beim Laufpuffer handelte es sich um 1 x TAE-Puffer. Die relative Größe von bekannten DNA-Fragmenten

konnte anhand eines im Gel aufgetrennten DNA-Größenstandards bestimmt werden (1kbp-Leiter bzw. 100bp-Leiter, GibcoBRL).

Ethidiumbromid-Stammlösung: - 1mg/ml in bidest. Wasser

50 x TAE-Puffer: - vor der Benutzung wird der Puffer 1:50 mit bidest. verdünnt

2 M	Tris
100 mM	EDTA
1 M	Essigsäure

10 x DNA-Blaumarker:

50 %	Glycerin
10 mM	Tris-HCl, pH 8.0
0,2 %	SDS
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau

3.2.7. Genotypisierung von GC-C-knock-out- und Wildtyp-Mäusen

Die der GC-C-knock-out-Zuchtlinie entstammenden Mäuse wurden auf ihren Genotyp hin untersucht. Hierzu wurde die Schwanzspitze (ca. 5 mm) der Mäuse kopiert. Die Präparation der genomischen DNA erfolgte nach dem "tissue protocol" der QIAamp DNA Kits der Firma QIAGEN. Die genomische DNA wurde in einem Standard-PCR-Verfahren eingesetzt. In zwei getrennten PCRs wurde der Lokus der GC-C bzw. der transgen, durch Wegfall der GC-C, entstandene NEO-Lokus untersucht. Die benutzten Primer hatten folgende Nukleinsäuresequenz:

GC-C s	5'-CTT CCC AGT GAT GTG TCA CAA ACG GGT-3'
GC-C as	5'-GAC GCT GAT CTC GTA GCT GCC ATT GC-3'
NEO s	5'-CAG CCG AAC TGT TCG CCA GGC TCA AGG C-3'
NEO as	5'-GCG ATA GAA GGC GAT GCG CTG CGA ATC-3'

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte konnte die Zuordnung der Mäuse zu den verschiedenen Genotypen erfolgen.

3.2.8. RNA-Präparation

Die Präparation der Gesamt-RNA aus INS-1-Zellen erfolgte unter Verwendung des oben aufgeführten RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen.

3.3. Arbeiten auf Peptid/Protein-Ebene

3.3.1. Proteinpräparation

Proteine wurden aus INS-1-Zellen extrahiert. Die Präparation des Proteoms erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen. Anfangs wurden die Zellen mit Proteasepuffer nach Feller aufgeschlossen. Im weiteren Verlauf der Experimente wurde auf den Einsatz von Proteasehemmern verzichtet. Die Zellen wurden direkt in Elektrophoresepuffer aufgenommen und sonifiziert. Unmittelbar vor der Beladung von Proteingelen wurde der Proteinextrakt mit 4 x Sample-Puffer der Firma Roth 5 min denaturiert (95°C), anschließend kurz auf Eis heruntergekühlt und zentrifugiert.

3.3.2. Proteingelelektrophorese (Tris-Glycin-SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen/Peptidgemischen im Bereich von 1-100 kDa wurden denaturierende Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgele [119] verwendet. Als Gelapparatur (inklusive Gelgießstand) diente das Mini-Protean III-Modell der Firma Bio-Rad. Nach dem Zusammenbau des Gelgießstandes wurde das Trenngel entsprechend Tab. 1 in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert und bis ca. 1 cm vor dem oberen Gelrand vorsichtig in den Plattenzwischenraum gefüllt. Anschließend wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet und 1 - 2 h bei Raumtemperatur zum Auspolymerisieren gerade und erschütterungsfrei stehen gelassen. Danach wurde das Isopropanol abgegossen, mit bidest. Wasser gespült und die letzten Wassertropfen mit Filterpapier entfernt. Im Anschluß wurde das Sammelgel (Tab. 1) gegossen und sofort der entsprechende Probenkamm von einer Seite her vorsichtig eingesteckt. Abschließend wurde nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels die Gelkammer zusammengebaut und in die entstandene obere Pufferkammer der Kathodenpuffer und in die äußere untere Kammer der

Anodenpuffer gefüllt. Nachdem der Probenkamm entfernt wurde, ist jede Proben tasche mit Kathodenpuffer mittels einer Mikroliterspritze gespült worden.

Prozentigkeit des Gels:	5%	7,5%	10%	12,5%	15%
H ₂ O	24,7	22,2	19,7	17,2	14,7
1,5 M Tris/HCl	10	10	10	10	10
AA/BAA (37,5:1; 40%)	5	7,5	10	12,5	15
SDS (10%)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

*) alle Angaben in ml

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Trenngele für die Tris-Glycin-SDS-PAGE*)

4 X Sammelgel (ca. 5,5%)	Angaben in ml
Millipore Wasser	2,9
10% SDS	0.05
Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA, 37.5:1, von Sigma)	0.75
3.4 g/100 ml Imidazol, mit HCl auf pH 6.8 einstellen 0.5 M	0.875
10% APS (aliquotiert und eingefroren)	0.08
TEMED, bei RT	0.008

Tab. 2: Zusammensetzung des verwendeten Sammelgels für die Tris-Glycin-SDS-PAGE

Vor der Auftrennung wurden die Proben 3:1 mit 4 x Probenauftragspuffer versetzt, 5 min bei 95°C im Thermomixer denaturiert, 10-20 min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert. Als Standard zur Abschätzung des Molekulargewichtes der Proteine wurde der „Seebblue™ Pre-Stained Standard“ der Firma Novex verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der denaturierten Proteine wurden die Gele

„geblottet“ (siehe unten) oder zur Sichtbarmachung der Proteinbanden mit Coomassie gefärbt.

Lösungen für Tricin-SDS-PAGE

Elektrodenpuffer

Tris-Base	6 g	
Glycin	28,8 g	
10% SDS	10 ml	ad 1000 ml mit Bidest.

4 x Probenpuffer „RotiLoad“ der Firma Carl Roth für reduzierende Gele

3.3.3. Coomassie-Färbung

Für die Anfärbung der Proteine wurden die Gele ≥ 30 min in Coomassie-Lösung vorsichtig geschüttelt und anschließend bis zum gewünschten Kontrast mit Entfärber-Lösung (oder \ddot{u} N mit bidest. Wasser) gewaschen. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Gele oder WESTERN-Blots fotografiert und/oder zur weiteren Bearbeitung eingescannt.

Lösungen für Coomassie-Färbung

Coomassie-Lösung:

0,2 %	Coomassie Brilliant Blue R-250
0,05 %	Coomassie Brilliant Blue G-250
42,5 %	Ethanol
5 %	Methanol
10 %	Essigsäure

Entfärber-Lösung:

30 %	Methanol
10 %	Essigsäure

3.3.4. Western Blot / Immunoblot

Zum Fixieren und zum immunochemischen Nachweis wurden die Proteine mittels Semidry-Blot auf Membranen gebunden. Für diese Methode wurden die nach einer

SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mittels der „Phase“-Semidry-Blot-Apparatur auf eine PVDF-Membran (Fluorotrans Transfer PVDF-Membran; 0,2 µm der Firma NEN-DUPONT) übertragen. Dazu wurde die auf die Gelgröße zugeschnittene Membran für 2 min in Methanol inkubiert und anschließend mit Transfer-Puffer gespült. Die SDS-Gele wurden ebenfalls in Transfer-Puffer leicht geschüttelt. Zur Speicherung des Transfer-Puffers diente das ca. 2 mm dicke Gel-Blotting-Papier (GB004) der Firma Schleicher&Schuell. Anschließend wurde der Blot in der Apparatur folgendermaßen aufgebaut (von unten [-] nach oben [+]).

- 1 bis 2 Lagen mit Transfer-Puffer getränktes Blotting-Papier
- Tricin-SDS-PAGE
- PVDF-Membran (0,2 µm)
- 1 bis 2 Lagen mit Transfer-Puffer getränktes Blotting-Papier

Abschließend wurde die Apparatur mit einem ca. 1 Kilogramm schweren Gewicht zusammengedrückt und mittels Stromfluß bei konstanten 0,24 Ampere die Proteine/Peptide auf die Membran transferiert. Nach etwa 90 min wurde der Elektro-Blot gestoppt und die Membran entsprechend der immunchemischen Detektion weiterbehandelt.

3.3.4.1. Chemoluminiszente Detektion mittels Meerrettich-Peroxidase

Zum spezifischen Nachweis bestimmter Proteine wurden die „geblotteten“ Membranen folgender immunchemischer Behandlung unterzogen.

- Für alle Schritte wurden $\approx 0,5$ ml Lösung je cm^2 Membran verwendet (Waschschritte mit doppelten Volumen) und bei RT und unter leichtem Schütteln durchgeführt.
- Dabei befand sich die Proteinseite der Membran immer oben.
- Es wurde zwei mal 5 min mit TBST-Lösung gewaschen.
- Die Membranen wurden ≥ 1 h bei RT in Block-Lösung der Firma Carl Roth geschüttelt und anschließend über Nacht in ebenfalls in RotiBlock mit primärem AK bei 4°C inkubiert.
- Es wurde fünf mal 5 min mit TBST-Lösung gewaschen.
- Anschließend wurde die Membran 1-2 h in RotiBlock mit sekundärem AK (konjugiert mit Meerrettich- Peroxidase [HRP]) inkubiert.

- Es wurde fünf mal 5 min mit TBST-Lösung gewaschen.
- Kurz vor der Benutzung wurde die Substratmischung für die HRP hergestellt. Es wurde das HRP-Substratsystem der Firma Pierce benutzt.
- In dieser HRP-Substratlösung wurde dann die Membran 1 min inkubiert. Abschließend konnte die Membran auf Röntgenfilmen exponiert werden (je nach Blot 2-60 min).

3.3.4.2. Lösungen für WESTERN-Blot

TBS-Lösung:	10 mM	Tris-HCl, pH 8.0
	150 mM	Natriumchlorid
TBST-Lösung:	-wie TBS-Lösung, aber mit Zusatz von 0,1 % Tween20	
Block-Lösung:	-RotiBlock	
Anodenpuffer:	RotiBlot A	
Kathodenpuffer:	RotiBlot K	

3.4. Weitere Arbeiten auf molekularer Ebene

3.4.1. Insulin-ELISA

Beim etablierten Insulin-ELISA handelt es sich um einen Double-Sandwich-ELISA. An einen im Überschuß vorhandenen demobilisierten primären Antikörper (anti-Meerschwein-Ig-G-Antikörper) wird ein sekundärer Antikörper (anti-Insulin-Antikörper aus Meerschwein) in limitierter Konzentration gekoppelt. Während der Immunreaktion konkurrieren das Insulin aus der Probe/Standard und das Peroxidase-konjugierte Insulin um die begrenzt verfügbaren Epitope der sekundären Antikörper. Nach den folgenden Waschschrritten hängt die Peroxidase-Konzentration im Immunowell vom "Erfolg" des Konjugates gegenüber dem Insulin in der Probe ab. Die Peroxidase-Konzentration verhält sich also umgekehrt proportional zur Insulinkonzentration der Probe. In der Substratreaktion setzt die Peroxidase Peroxid um und führt dadurch konzentrationsabhängig zu einer Konformationsänderung des OPD (o-Phenylenediaminedihydrochlorid). Diese Substratreaktion wird durch Denaturierung der Peroxidase mit H_2SO_4 beendet. Die Intensität des resultierenden Farbumschlages von farblos nach braun wird bei 490 nm gemessen und ist ein Maß

für die Insulinkonzentration der eingesetzten Probe. Im folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte beschrieben:

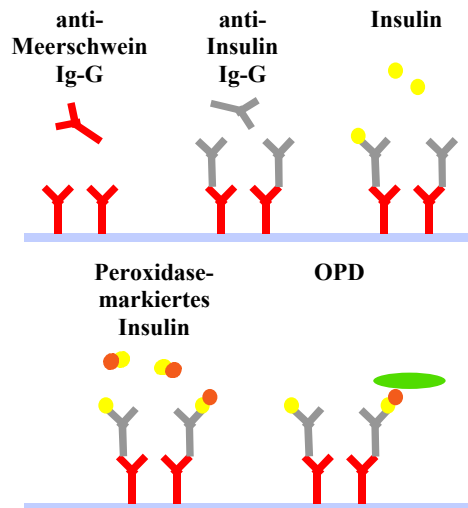


Abb. 9: Aufbau und Standardkurve des zur Messung von Insulinkonzentrationen genutzten spezifischen Insulin-ELISA

Coating: Mit anti-Meerschwein-Ig-G (ICN) in Carbonat/Bicarbonat-Puffer (SIGMA) bei RT. Der Antikörper wurde in der Endverdünnung von 1:1.000 eingesetzt. Die Mikrotiterplates wurden 2 Stunden bei 37 °C unter wassergesättigter Atmosphäre inkubiert.

Waschen: Es erfolgten zwei Waschgänge mit PBS-Tween. Die Inkubationszeit betrug jeweils 1 min.

Immunreaktion: Bei 4°C wurden je 80 µl Probe bzw. Standard in jedes well pipettiert. Es erfolgte die Zugabe von Peroxidasekonjugiertem Insulin (SIGMA) zur Endverdünnung von 1:10.000, von Anti-Insulin-Ig-G aus Meerschweinchen (DAKO) zur Endverdünnung von 1:100.000 und von BSA zur Endkonzentration von 0,1 %. Die Immunreaktion erfolgte über Nacht (18-24 h) bei 4°C unter wassergesättigter Atmosphäre

Waschen: Es erfolgten drei Waschgänge mit PBS-Tween bei 4°C. Die Inkubationszeit betrug jeweils 1 min.

Substratinkubation: Die wells der Microtiterplates wurden 30 min bei RT und ohne Licheinwirkung min einer OPD/Substratlösung, hergestellt mit einem bei der Firma SIGMA erhältlichen Tablettenset, und H₂O inkubiert.

Stop: Der Abbruch des enzymatischen Umsatzes von Peroxid erfolgte durch Denaturierung der Peroxidase mit H₂SO₄ in der Endkonzentration von 400 mM. Die optische Dichte wurde bei 490 nm gemessen.

3.4.2. ELISA für zyklische Nukleotide (cAMP- und cGMP-ELISA)

Zyklische Nukleotide wurden mit spezifischen "double sandwich ELISAs" nachgewiesen. Bei Experimenten mit Langerhans'schen Inseln wurden die Konzentrationen im Überstand detektiert. Nach Inkubationsexperimenten mit INS-1-Zellen wurden diese mit 70 % Ethanol aufgeschlossen. Die ELISA-Kits wurden vom Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung (IHF) Hamburg bezogen. Die Möglichkeit, die intrazellulären *second messenger* extrazellulär zu messen, ist durch die von Jedlitschky *et al.* [120] beschriebene Funktion von Multidrug Resistance Protein 5 (MRP5) als Exportpumpe für zyklische Nukleotide gegeben.

3.4.3. Messung von Kationenkonzentrationen in wässrigen Lösungen

Die Messung von Natrium-, Kalium- und Kalziumionenkonzentrationen im Urin und in filtrierten Kotalaufschlemmungen von Mäusen erfolgte mit dem teilautomatischen Flammenphotometer „Eppendorf EFIX 5055“ der Firma Eppendorf im klinisch-chemischen Labor der Medizinischen Hochschule Hannover.

3.4.4. Messung von Chloridionenkonzentrationen in wässrigen Lösungen

Die Messung von Chloridionenkonzentrationen im Urin und in filtrierten Kotalaufschlemmungen von Mäusen erfolgte mit dem „Chloride Analyzer 925“ der

Firma Corning im klinisch-chemischen Labor der Medizinischen Hochschule Hannover.

3.4.5. Messung von zytosolischen Kalziumkonzentrationen an Einzelzellen

Die Messung zytosolischer Kalziumkonzentrationen wurde mithilfe des zytoplasmamembranpermeablen Esters Fura II an der Kalziummeßanlage der IPF PharmaCeuticals GmbH durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff Fura II läßt sich unter Abwesenheit freien Kalziums bei 320 nm zur Emission anregen. Wird Kalzium gebunden, findet auf Anregung mit 320 nm hin kaum mehr Emission statt. Die Anregungswellenlänge wird um 40 nm nach 360 nm verschoben. Diese Verschiebung wird für die Quantifikation der Kalziumionen genutzt. In der Praxis dreht sich zwischen der Lichtquelle und dem Objekt, der Fura II-beladenen Zelle, ein Filtrerrad mit 3 Filtern. 10 mal pro Sekunde werden die Zellen mit drei verschiedenen Wellenlängen angeregt: 320, 340 und 360 nm. 340 nm gelten hierbei als Referenz. Die emittierten Photonen werden durch einen Photonenzähler quantifiziert. Sind wenig Kalziumionen im Zytoplasma verfügbar, ist die Zahl der nach Anregung mit 320 nm emittierten Photonen wesentlich höher, als jene bei 360 nm. Andersherum verhält es sich für hohe zytosolische Kalziumkonzentrationen. Zur Auswertung wird der Quotient aus den beiden Meßwerten einer jeden Filtrerradumdrehung herangezogen. Ein steigender Quotient steht für Kalziumioneneinstrom in das Zytoplasma, wird der Quotient kleiner, verringert sich das zytoplasmatische Kalziumlevel.

Für die Versuche an der Kalziummeßanlage wurde Krebs-Ringer-Hepes-Puffer mit einem pH von 7,4 bei einer Temperatur von 37°C benutzt.

3.5. Arbeiten auf zellulärer Ebene

3.5.1. Isolation Langerhans'scher Inseln aus Ratten und Mäusen

Die Isolation Langerhans'scher Inseln aus Ratten und Mäusen erfolgte unter Verwendung von Collagenase P der Firma Boehringer Mannheim. Das Protokoll wurde leicht modifiziert von Gotoh *et al.* [121] übernommen [122].

3.5.2. Gewebekultur Langerhans'scher Inseln

Die Langerhans'schen Inseln wurden in 30 mm Petrischalen zur Gewebekultur (für nicht adhärente Zellen) kultiviert. Das Medium bestand aus RPMI 1640 (Gibco BRL) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin. Die Langerhans'schen Inseln wurden bis zu vier Wochen in Primärkultur gehalten.

3.5.3. Sekundärkultur von INS-1-Zellen

Die INS-1-Zellen wurden in 75 cm³- sowie in 125 cm³-Flaschen der Firma Sarstedt kultiviert. Für verschiedene Bioassays wurden sie in 24-well-plates (Cell⁺ von Sarstedt). Das Zellkulturmedium bestand aus RPMI 1640 (Gibco BRL) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 10 mM HEPES sowie 50 µM Mercaptoethanol [123].

3.5.4. Perifusion

Zur Perifusion von INS-1-Zellen und Langerhans'scher Inseln wurde das 'Suprafusion System' der Firma Brandel benutzt.

Die Perifusion von Zellen und Geweben an diesem Gerät ermöglicht den Nachweis differentieller sekretorischer Aktivität auf geeignete Stimuli hin.

Konstanter Fluß und definiert eingestellte Temperatur des Puffers erlauben an insgesamt 6 Kanalsystemen vergleichbare

Versuchsbedingungen. So kann eine parallele Einspeisung verschiedenster Agonisten wie etwa

Guanylin oder Glukose, und Antagonisten erfolgen. Voraussetzung für die Vergleichbarkeit

der Ansätze ist die vergleichbare Menge an eingebetteten Zellen/Gewebe pro Kanalsystem.

Die Perifusion erfolgte mit Krebs-Ringer-Hepes-Puffer. Da Probleme bei der Einbettung von INS-1-Zellen auftraten, die nicht vollständig behoben werden konnten, wurde das Gerät in erster Linie zu Beginn der Arbeit eingesetzt.



Abb. 10: 'Suprafusion System' von der Firma Brandel.

3.5.5. Inkubationsexperimente

Inkubationsexperimente wurden mit INS-1-Zellen und Langerhans'schen Inseln aus Mäusen und Ratten durchgeführt. Für Experimente mit INS-1-Zellen wurden 24-well-plates der Qualität 'cell plus' der Firma Sarstedt[®] verwendet. Die Zellen wurden zur 100%-igen Konfluenz kultiviert. Die Applikation von Probesubstanzen fand in Krebs-Ringer-Hepes-Puffer statt. Während der Inkubationszeit ($1 \text{ min} \leq t \leq 8 \text{ h}$) befanden sich die Plates im Zellkulturbrutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit.

3.6. Arbeiten mit Tieren

3.6.1. Organentnahme aus Mäusen und Ratten

Zur *in vitro*-Untersuchung von Langerhans'schen Inseln wurde Mäusen und Ratten das Pankreas entnommen. Dieser Eingriff erfolgte *post mortem*.

3.6.2. Stoffwechseluntersuchungen an Mäusen

3.6.2.1. Untersuchung von Mäusen im Stoffwechsellkäfig

Die Untersuchung wurde an GC-C-Wildtyp- und GC-C-knock-out-Mäusen in Stoffwechsellkäfigen durchgeführt. Nach einer nur in diesem System möglichen Trennung des Kotes vom Urin der Tiere konnten qualitative wie quantitative Untersuchungen der genannten Komponenten durchgeführt werden. Genannt seien an dieser Stelle:

- Futter- und Wasseraufnahme
- Menge des Urines und Kotes
- Konzentration von Chlorid-, Kalium-, Kalzium- und Natrium-Ionen im Urin und Kot etc.

3.6.2.2. Oraler Glukosetoleranztest an Mäusen

Im Glukosetoleranztest an GC-C-knock-out-Mäusen und Wildtyp-Mäusen wurde die Kompetenz der Mäuse hinsichtlich der insulinabhängigen Blutglukoseregulation charakterisiert. Am sinnvollsten erwies sich dabei folgender Versuchsaufbau:

- | | |
|-------------|--|
| t = -30 min | Blutglukosebestimmung |
| t = -20 min | Blutglukosebestimmung |
| t = -10 min | Blutglukosebestimmung |
| t = 0 | Blutglukosebestimmung; Glukoseapplikation bzw. Kontrolle |
| t = 10 min | Blutglukosebestimmung |
| t = 20 min | Blutglukosebestimmung |
| t = 30 min | Blutglukosebestimmung |
| t = 45 min | Blutglukosebestimmung |

t = 60 min	Blutglukosebestimmung
t = 75 min	Blutglukosebestimmung
t = 90 min	Blutglukosebestimmung
t = 120 min	Blutglukosebestimmung
t = 150 min	Blutglukosebestimmung
t = 180 min	Blutglukosebestimmung
t = 240 min	Blutglukosebestimmung

Bei t = -30 wurde der Schwanz der Mäuse um ca. 1 mm gekürzt. Für jede der anschließenden Messungen wurden ca. 2,5 µl Blut aus der Schwanzspitze entnommen. Die 30 min Vorlaufzeit zum Versuch dienten der Adaptation der Mäuse und der Einstellung einer Blutglukose-Baseline. Die Applikation der Glukose- und Kontrolllösungen erfolgte mittels einer Magensonde. Die Kontrolllösung bestand aus isotonischer (0,9 %) Kochsalzlösung. Die Glukoselösung enthielt zusätzlich 25 % Glucose. Es wurden (Mausgewicht in g x 10) µl Lösung eingesetzt. Als Beispiel: bei einem Mausgewicht von 28 g → 280 µl.

3.7. Statistik

Mittelwerte und Standardabweichung, sowie T-Tests auf Signifikanz wurden mithilfe von MS Excel (Seattle, USA) und GraphPad Prism (San Diego, USA) erstellt. p-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Die GC-C-knock-out-Maus

Basis des Projektes war der bereits in der Einleitung beschriebene Nachweis der GC-C und des Guanylins in der Langerhans'schen Insel durch Prof. Dr. M. Reinecke. Die GC-C wurde hierbei in den α - und in den β -Zellen nachgewiesen. Guanylin kommt in Kolokalisation mit Glucagon in den α -Zellen vor. Zur Klärung der physiologischen Bedeutung der GC-C wurde das Maus knock-out Model herangezogen. Die GC-C-knock-out-Mäuse wurden von Prof. Dr. D. Garbers zur Verfügung gestellt. Die Verifizierung des knock-out erfolgte bei allen Mäusen der Inzuchtlinie mittels PCR.

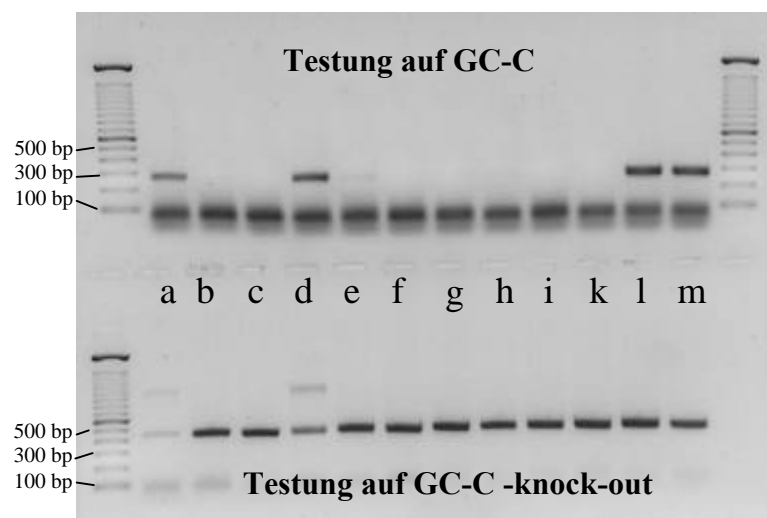


Abb. 11: Der Genotyp der Mausexzuchtlinien aus den GC-C-knock-out-Linien wurde mittels PCR getestet. In der oberen Abbildungshälfte sieht man den Test der Tiere „a“ bis „m“ auf das GC-C-Gen. Die Tiere „a“, „d“, „l“ und „m“ sind positiv für den GC-C-Locus. In der unteren Abbildungshälfte ist der Test auf den GC-C-knock-out dargestellt. Hier sind mit Ausnahme des Tieres „a“ alle positiv. Aus diesen beiden Aussagen geht hervor, daß Tier „a“ eine Wildtyp-Maus ist. Die Tiere „d“, „l“ und „m“ sind heterozygot. Den verbleibenden Tieren fehlt das intakte GC-C-Gen vollständig. Sie sind GC-C-knock-out-Mäuse.

Bei einigen Tieren wurde zusätzlich die Immunhistochemie als Nachweismethode herangezogen (Abb. 122).

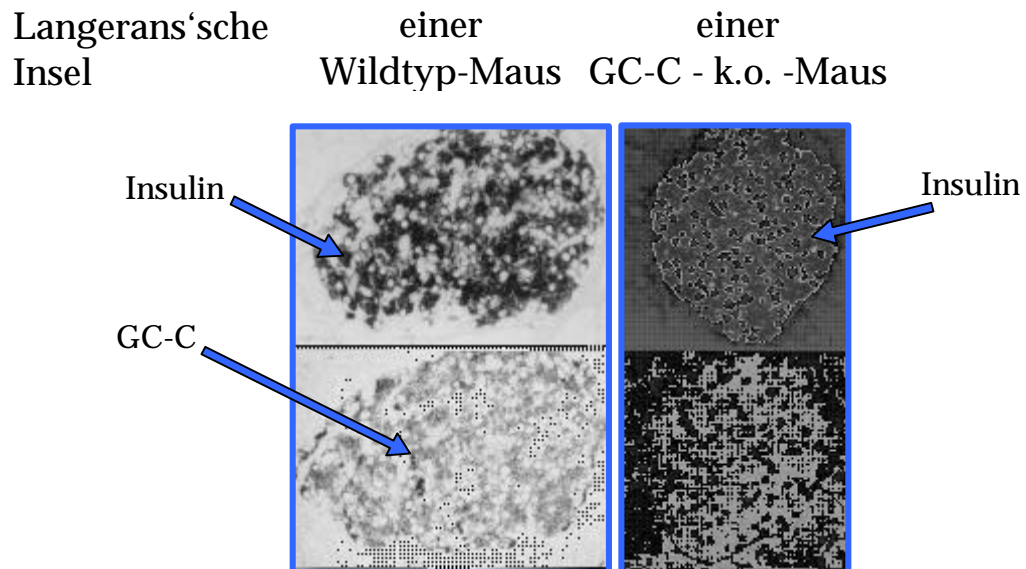


Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis von Insulin und GC-C in Langerhans'schen Inseln. In der linken Bildhälfte sind die Nachweise von Insulin und GC-C in Langerhans'schen Inseln von Wildtyp-Mäusen dargestellt. Präparationen von GC-C-knock-out-Mäusen (rechte Bildhälfte) zeigen zwar Insulin, aber keine GC-C.

4.2. Physiologischer Vergleich von GC-C-knock-out-Mäusen und Wildtyp-Mäusen

Ein äußerlicher Phänotyp wird durch den knock-out der GC-C nicht hervorgerufen. Eingehendere physiologische Untersuchungen folgten auf zwei Gebieten. Die Bedeutung der GC-C im intestinalen Bereich ist unumstritten. Um in diesem Bereich Funktionsstörungen aufzudecken, wurde ein Tierversuch mit Mäusen in Stoffwechselläufigen durchgeführt. Die andere, in diesem Projekt zu klärende, Relevanz liegt im Einfluß des GC-C-knock-out auf den Insulinhaushalt. Hierzu wurden Glukosetoleranztests durchgeführt.

4.2.1. Haltung von GC-C-knock-out-Mäusen in Stoffwechselkäfigen

Untersucht wurde ein Kollektiv bestehend aus fünf GC-C-knock-out-Mäusen. Als Kontrolle diente eine gleichstarke Gruppe von Wildtyp-Mäusen. Die Mäuse wurden 10 mal je 24 Stunden in speziellen Einzel-Stoffwechselkäfigen gehalten. Bei diesem Versuch konnten Wasser- und Futteraufnahme, sowie Kot- und Urinausscheidung quantifiziert werden. Ferner wurden an den Exkrementen qualitative Untersuchungen durchgeführt. Es wurden folgende Gewichtsbestimmungen mit folgenden Ergebnissen durchgeführt:

Untersuchter Parameter	GC-C-knock-out-Mäuse	Wildtyp-Mäuse
Wasseraufnahme je 24 h	(4,66 ± 0,23)g	(4,28 ± 0,31)g
Futteraufnahme je 24 h	(2,68±0,22)g	(2,46±0,34)g
Diurese je 24 h	(1,81±0,18)g	(1,84±0,16)g
Kotabgabe je 24 h	(1,41±0,13)g	(1,20±0,16)g

Tab. 3: In den hier untersuchten untersuchten makroskopischen Parametern unterscheiden sich die GC-C-knock-out-Mäuse nicht von Wildtyp-Mäusen. Die Werte setzen sich als (Mittelwert ± Standardabweichung) zusammen.

Während eines 24-stündigen Aufenthaltes im Stoffwechselkäfig verloren die Mäuse jeweils ca. 10% ihres Körpergewichtes. Im Folgenden wurden in Kot und Urin die Konzentrationen folgender Elektrolyte gemessen:

Untersuchter Parameter	GC-C-knock-out-Mäuse	Wildtyp-Mäuse
Kaliumionen im Urin	(264,3 ± 16,9)mM	(259,6 ± 14,7) mM
Natriumionen im Urin	(105,6 ± 5,8) mM	(102,5 ± 4,6) mM
Kalziumionen im Urin	(3,65 ± 0,82) mM *	(2,88 ± 0,48) mM *
Chlorid-Ionen im Urin	(161,4 ± 12,0) mM	(164,5 ± 10,3) mM
Kaliumionen im Kot	(10,7 ± 2,5) mM	(12,4 ± 2,4) mM
Natriumionen im Kot	(15,5 ± 3,3) mM *	(20,2 ± 2,9) mM *
Kalziumionen im Kot	(2,94 ± 0,52) mM *	(2,13 ± 0,36) mM *
Chlorid-Ionen im Kot	(21,5 ± 7,6) mM	(24,3 ± 8,5) mM

Tab. 4: GC-C-knock-out-Mäuse und Wildtyp-Mäuse unterscheiden sich in drei der hier untersuchten physiologischen Parameter (* = $p < 0,05$). Die Werte setzen sich als (Mittelwert ± Standardabweichung) zusammen.

Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Mäusen und GC-C-knock-out-Mäusen treten bei der Kalziurese und der Kalzium- sowie Natriumausscheidung über den Kot auf. Während die Kalziumwerte für GC-C-knock-out-Mäuse erhöht sind, ist die Natriumausscheidung über den Kot verringert.

4.2.2. Glukosetoleranztest

Im Glukosetoleranztest an GC-C-knock-out-Mäusen und Wildtyp-Mäusen wurde die Kompetenz der Tiere hinsichtlich der insulinabhängigen Blutglukoseregulation charakterisiert. Dieses Maß zur Bestimmung der Fähigkeit der Tiere, ihren Blutglukosespiegel zu regulieren leitet sich aus zwei Parametern ab. Zum einen ist dies die maximale Blutglukosekonzentration als relativer Wert nach Applikation der Glukoselösung. Der zweite Wert ergibt sich aus dem Absinken des Blutglukosespiegels. Verglichen wurde hier, wie lange die Mäuse brauchten, um ihren Blutglukosespiegel wieder auf Normalniveau zu reduzieren.

Glukosetoleranztest an GC-C-knock-out-Mäusen

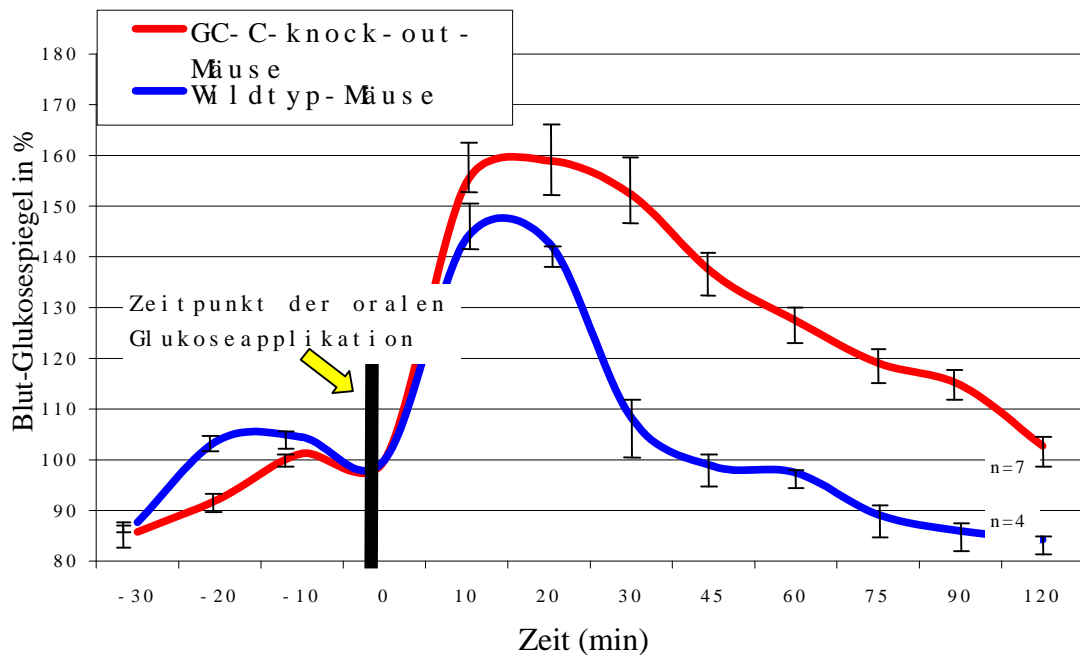


Abb. 13: Dargestellt sind Blutglukosekurven. Der Genotyp der Mäuse ist farblich gekennzeichnet: rot GC-C-knock-out, blau Wildtyp. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde die Glukoselösung oral appliziert. Es ist zu erkennen, daß die knock-out-Mäuse länger für die Regulierung ihres Blutglukoses brauchen, als die Wildtyp-Mäuse.

		Zeit [min]	-30	-20	-10	0	10	20	30	45	60	75	90	120
GC-C-knock-out-Mäuse	Mittelwert [%]		86	92	101	100	155	159	152	137	127	119	115	103
	Standardabweichung		4.5	3.9	2.6	0.0	8.0	14.0	13.2	8.8	7.4	6.2	5.6	5.8
Wildtyp-Mäuse	Mittelwert [%]		88	104	104	100	144	143	108	99	97	89	86	84
	Standardabweichung		1.8	3.3	3.4	0.0	8.8	3.6	10.9	6.0	3.2	5.9	5.2	3.3

Tab. 5: Wertetabelle zu Abb. 13

Durch die Ermittlung des Integrals der Blutglukosekurven vom Zeitpunkt der Glukoseapplikation ($t = 0$) bis zum durchschnittlichen Zeitpunkt der Renormalisierung ($t = 90$ min) erhält man einen Wert, der die maximalen Blutglukosespiegel und die Blutglukosedynamik in sich vereint. Dieses Integral

spiegelt in umgekehrt proportionaler Weise die Fähigkeit der Tiere zur Blutglukoseregulation dar.

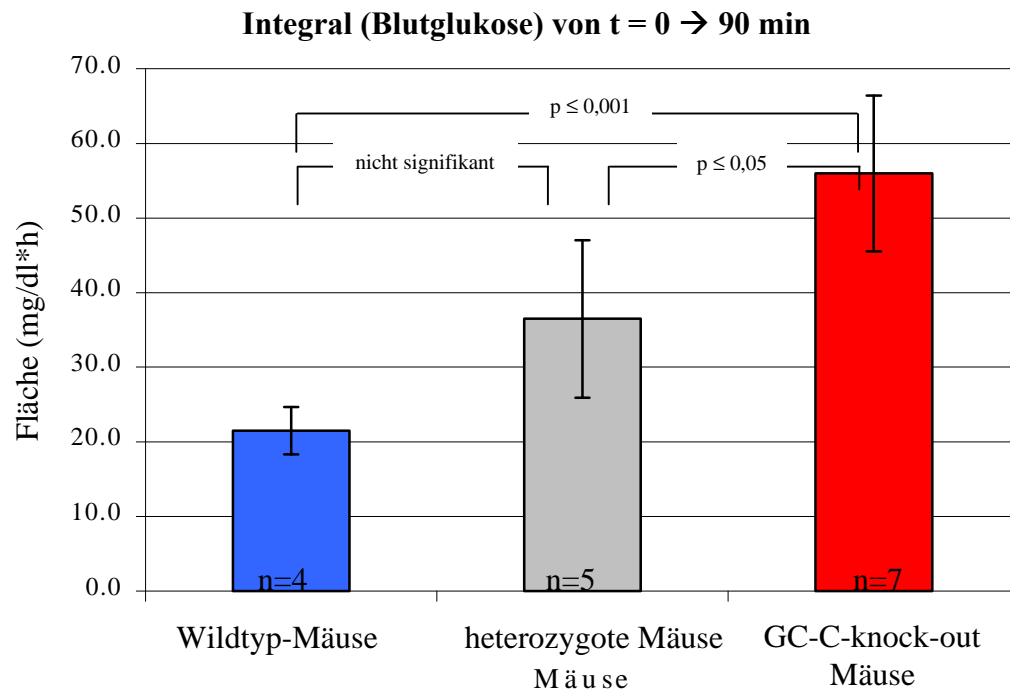


Abb. 14: Aufgetragen ist ein Maß für die Dysfunktion der Blutglukoseregulation. Das Parameter der Ordinate bezieht die Fläche unter den in Abb. 13 dargestellten Kurven von t = 0 bis t = 90 min. Somit geben die dargestellten Balken Aufschluß über die Fähigkeit der Tiere, ihren Blutglukosespiegel zu regulieren. Je höher der Balken, desto größere Schwierigkeiten hat die Population, den Blutglukose nach oraler Glukosegabe auf Normalwerte zu reduzieren.

Genotyp	Mittelwert der Integrale	Standardabweichung
GC-C-knock-out-Mäuse	56.0	10.5
heterozygote Mäuse	36.5	10.6
Wildtyp-Mäuse	21.5	3.2

Tab. 6: Wertetabelle zu Abb. 14

Wie man in Abb. 14 sieht, weisen GC–C knock-out Mäuse Defizite in der Regulation ihres Blutglukosespiegels auf. Der maximale gemessene Blutglukosespiegel liegt bei ihnen höher, als bei Wildtyp-Mäusen. Desweiteren ist die Resorption der

zirkulierenden Glukose gestört. Dies manifestiert sich darin, daß sie länger als Wildtyp-Mäuse brauchen, um den Blutglukosespiegel wieder auf Normalniveau einzustellen.

4.3. Zell- und Molekularbiologische Arbeiten

4.3.1. Guanylin induziert eine Insulinfreisetzung aus pankreatischen β -Zellen

An pankreatischen β -Zellen konnte gezeigt werden, daß Guanylin dosisabhängig Insulin freisetzt. Versuche hierzu wurden an Langerhans'schen Inseln aus Mäusen und Ratten, wie auch an den β -Zelllinien INS-1 und Rin5mF (beide Ratte) durchgeführt. Die Wirksamkeit Guanylins konnte in allen Fällen ab Applikationskonzentrationen von 0,1 μ M nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 1 μ M Guanylin entsprach die Intensität der Insulinfreisetzung der Stärke des physiologischen Stimulus von 18 mM Glukose. Der Nachweis der insulinotropen Aktivität Guanylins stellt gemeinsam mit dem Nachweis der GC-C in der pankreatischen β -Zelle die Grundlage der vorliegenden Arbeit dar. Im Folgenden konnte die Signaltransduktionskaskade vom Guanylin bis zur Freisetzung des Insulins charakterisiert werden.

4.3.2. Auch Uroguanylin und STa setzen Insulin aus pankreatischen β -Zellen frei.

Nach Guanylin wurde auch die Wirksamkeit der verwandten Peptide Uroguanylin und STa untersucht. In Inkubationsexperimenten mit INS-1-Zellen wurde festgestellt, daß die Applikation beider Substanzen eine Insulinfreisetzung bewirkt. Für Uroguanylin konnten ähnliche Wirkkonzentrationen wie für Guanylin festgestellt werden. STa wirkt in etwa 10-fach geringeren Konzentrationen, als Guanylin. Bei einer Applikationskonzentration von 100 nM findet eine signifikante Insulinausschüttung aus INS-1-Zellen statt. Diese Ergebnisse geben ein weiteres Indiz für die Beteiligung der GC-C an der guanylinvermittelten Insulinfreisetzung.

4.3.3. Wirksamkeit der "langen" Form von Guanylin (22-115) auf die Insulinfreisetzung aus INS-1-Zellen

Über die Aktivität von Guanylin (22-115) im intestinalen Bereich liegen widersprüchliche Daten vor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Potenz in der Insulinfreisetzung an INS-1-Zellen vergleichend für Guanylin 22-115 und Guanylin 101-115 festgestellt. In Inkubationsexperimenten wurden für beide Peptide Dosis-Wirkungskurven erstellt. In Abb. 15 sind die Ergebnisse bei der Konzentration von 1 μ M dargestellt.

Insulinfreisetzung durch Guanylin 22-115 und 101-115

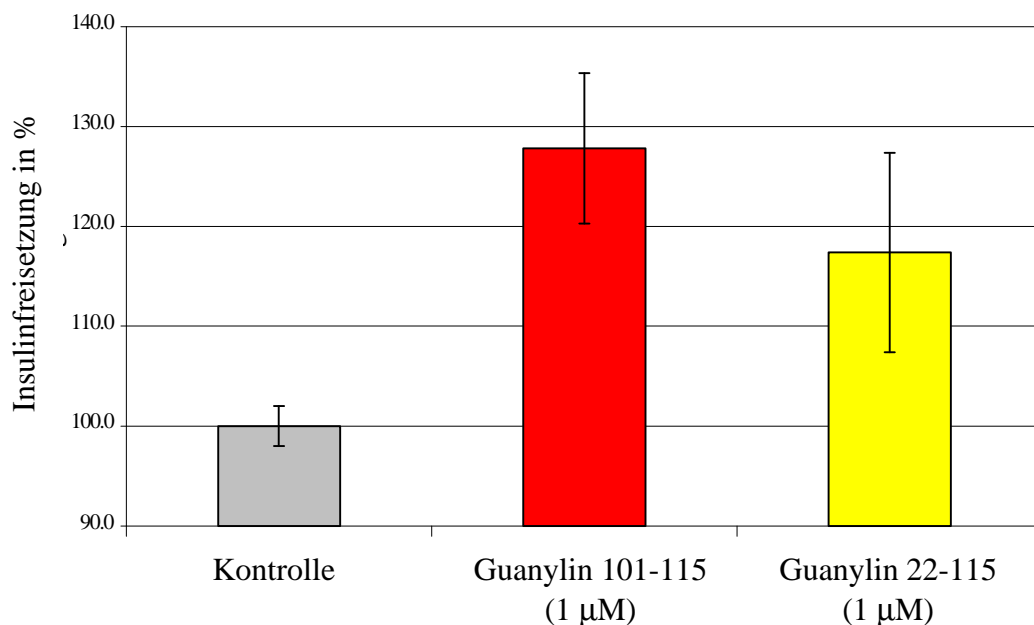


Abb. 15: An INS-1-Zellen zeigt Guanylin 22-115 eine ähnlich hohe Aktivität wie Guanylin 101-115.

	Mittelwert der Insulinfreisetzung in %	Standardabweichung
Negativkontrolle	100,0	11,2
Guanylin 101-115 (1 μ M)	127,8	10,0
Guanylin 22-115 (1 μ M)	117,4	13,2

Tab. 7: Wertetabelle zu Abb. 15

4.3.4. Die insulinotropen Wirkungen von Glukose und Guanylin sind additiv

Im Rahmen der Fragestellung, ob Guanylin und Glukose mithilfe der gleichen biochemischen Mechanismen Insulin aus β -Zellen freisetzen, wurde überprüft, ob ihre Effekte additiv sind. Eine Additivität der Wirkungen wäre ein Zeichen für weitestgehend getrennte Signaltransduktionskaskaden. Im Inkubationsexperiment mit INS-1-Zellen wurden Guanylin (1 μ M) und Glukose (18 mM) sowohl separat, als auch gemeinsam appliziert.

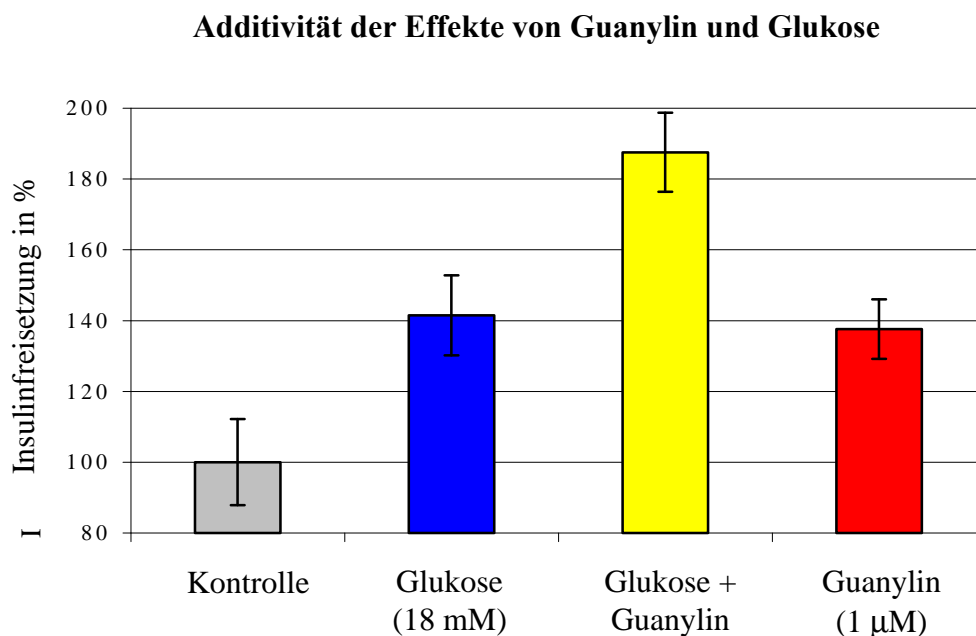


Abb. 16: Die insulinotropen Effekte von Glukose und Guanylin sind bei den angegebenen Konzentrationen additiv. Die kombinierte Stimulation durch Glukose und Guanylin erreicht die doppelte Intensität der Einzelstimulationen.

	Mittelwert der Insulinreisetzung in %	Standardabweichung
Negativkontrolle	100	12
Glukose (18 mM)	141	11
Glukose + Guanylin	188	11
Guanylin (1 μ M)	138	8

Tab. 8: Wertetabelle zu Abb. 16

Die gemeinsame Applikation von Glukose (18 mM) und Guanylin (1 μ M) verursacht eine höhere Insulinfreisetzung, als die einzelne Applikation der Substanzen. Mathematisch betrachtet führt die Addition der Agonisten zu einer Addition der sezernierten Insulinmenge. Diese Daten weisen darauf hin, daß die guanylinabhängige und die glukoseabhängige Insulinsekretion auf getrennten biochemischen Wegen vermittelt wird.

4.3.5. Die GC-C ist essentiell für die guanylininduzierte Insulinfreisetzung

Die nächste Teilaufgabe bestand darin, zu untersuchen, ob der insulinotrophe Effekt Guanylins tatsächlich über den Rezeptor GC-C vermittelt wird. Zu diesem Zweck wurden Langerhans'sche Inseln aus Wildtyp-Mäusen und GC-C knock-out Mäusen isoliert. In Inkubationsexperimenten wurden die Langerhans'schen Inseln Guanylin ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Experimente unter Applikation von Puffer. Als Positivkontrolle diente 18 mM Glukose. Die Ergebnisse zeigen im Falle der Wildtyp-Inseln wie auch im Falle der GC-C knock-out Inseln eine Insulinfreisetzung nach Glukoseapplikation. Die Langerhans'schen Inseln der Wildtyp-Mäuse setzen auch nach Guanylinapplikation Insulin frei. Bei den GC-C knock-out Inseln konnte diese Freisetzung nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse legen nahe, daß der insulinotrophe Effekt Guanylins auf der Aktivierung der GC-C beruht.

Glukoseabhängige Insulinfreisetzung aus Langerhans'schen Inseln

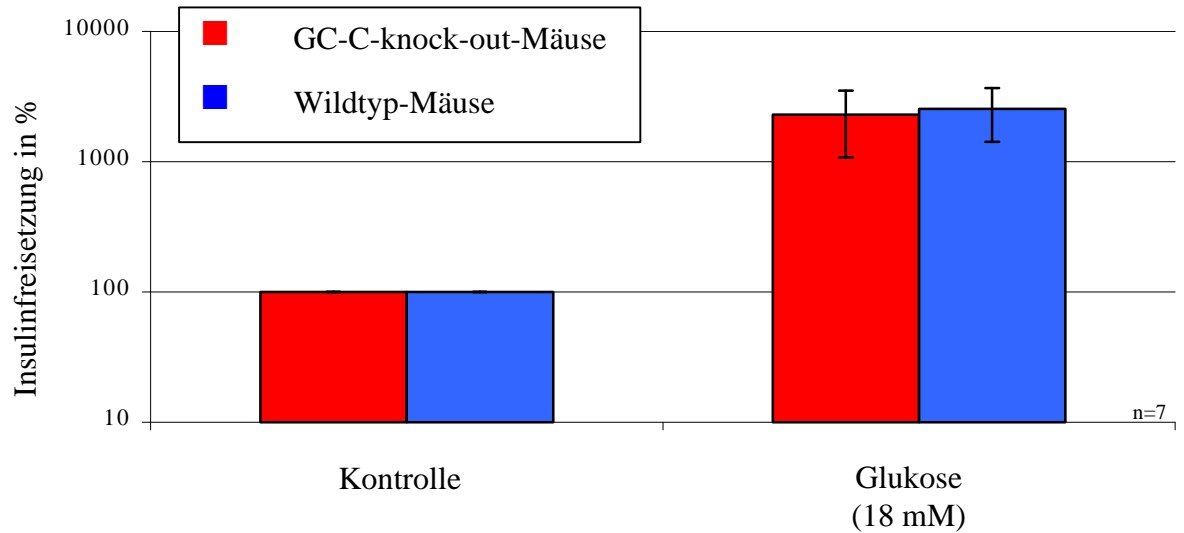


Abb. 17: Der GC-C knock-out hat keinen Einfluß auf die glukoseabhängige Insulinsekretion. Die Reaktion von Langerhans'schen Inseln aus Wildtyp- und knock-out-Mäusen ist identisch.

	GC-C-knock-out-Mäuse	Wildtyp-Mäuse
Kontrolle	100 %	100 %
Glukose (18 mM)	2295 %	2541 %

Tab. 9: Wertetabelle zu Abb. 17

Guanylinabhängige Insulinfreisetzung aus Langerhans'schen Inseln

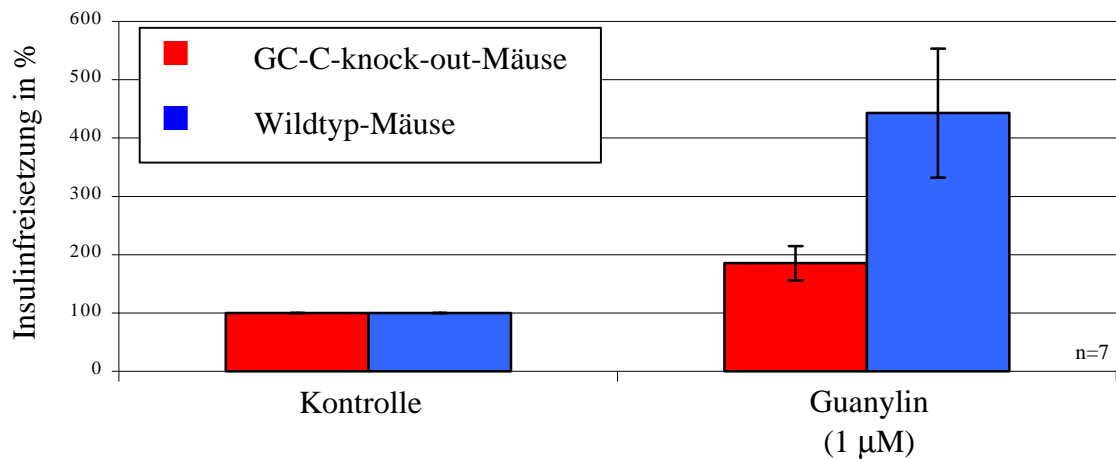


Abb. 18: Der GC-C knock-out hat einen starken Einfluß auf die guanylinabhängige Insulinsekretion. Die Reaktion von Langerhans'schen Inseln aus Wildtyp-Mäusen fällt wesentlich stärker aus, als die Reaktion von Inseln aus GC-C knock-out-Mäusen.

	GC-C-knock-out-Mäuse	Wildtyp-Mäuse
Kontrolle	100 %	100 %
Guanylin (1 µM)	186 %	443 %

Tab. 10: Wertetabelle zu Abb. 18

4.3.6. Zyklische Nukleotide und die Insulinfreisetzung

Die GC-C katalysiert die Bildung von cGMP (zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat) aus GTP (Guanosintriphosphat). cGMP ist ein verbreiteter *second messenger* und hat in vielen Zelltypen Funktionen in der Signaltransduktion. Ein weiteres zyklisches Nukleotid und *second messenger* ist das cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat). Seine Rolle in der Insulinfreisetzung ist unumstritten. Die cAMP-Konzentrationen steigen nach Glukoseaufnahme in pankreatischen β -Zellen. Durch diese Anreicherung kommt es über weitere Zwischenschritte zur Insulinfreisetzung.

In den Experimenten zur Charakterisierung der Rolle der zyklischen Nukleotide als *second messenger* in der guanylinabhängigen Insulinfreisetzung wurden dementsprechend die cGMP-Level gemessen. Da Glukose als Positivkontrolle diente, wurden auch die cAMP-Konzentrationen detektiert. Messungen wurden begleitend zu den Inkubationsversuchen im vorhergehenden Punkt unter der Überschrift " Die GC-C ist essentiell für die Guanylininduzierte Insulinfreisetzung " durchgeführt. Die im Überstand gemessenen Konzentrationen zyklischer Nukleotide lassen einen Rückschluß auf die Dynamik ihrer zytosolischen Konzentration zu [120]. Deswegen konnte auf die aufwendige und verlustreiche postexperimentelle Präparation der Langerhans'schen Inseln verzichtet werden.

Es zeigte sich, daß cAMP im Falle eines Glukosestimulus hochreguliert wird. Dies gilt für Langerhans'sche Inseln aus Wildtyp-Mäusen wie auch für Langerhans'sche Inseln aus GC-C knock-out Mäusen. Guanylin hat in keinem der beiden Fälle einen Einfluß auf die cAMP-Konzentration. Die cGMP-Konzentrationen blieben von Glukose gänzlich unbeeinflusst. Guanylin erhöht die cGMP-Konzentration deutlich. Dieser Effekt tritt jedoch nur bei den Langerhans'schen Inseln aus Wildtyp-Mäusen auf. Langerhans'sche Inseln aus GC-C knock-out Mäusen bleiben hinsichtlich ihrer cGMP-Level von Guanylin gänzlich unberührt.

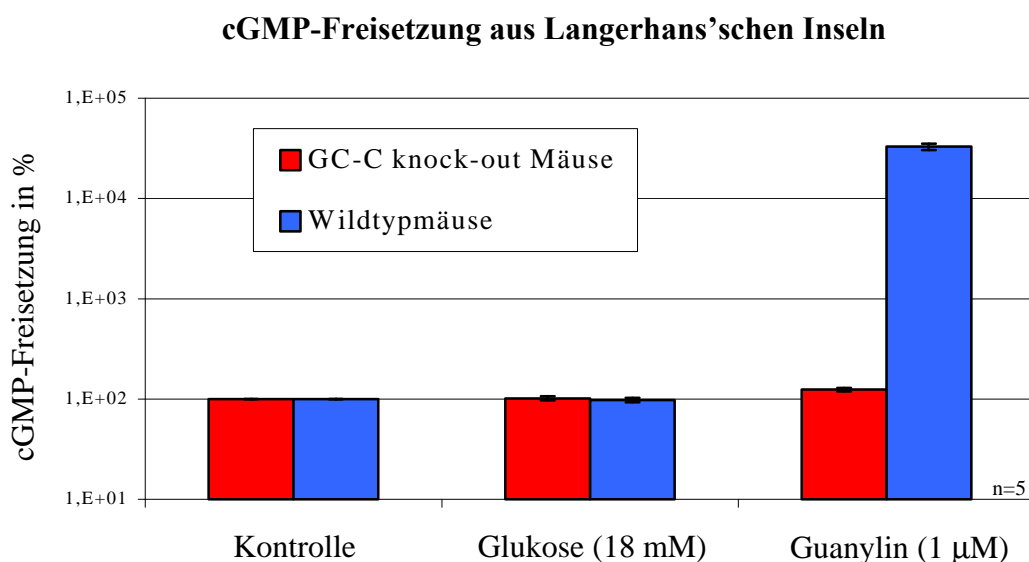


Abb. 19: Glukose hat in Langerhans'schen Inseln der Maus keinerlei Einfluß auf die cGMP-Level. Durch Guanylin werden die cGMP-Level erhöht. Dieser Effekt tritt bei Langerhans'schen Inseln aus GC-C-knock-out-Mäusen nicht auf. Die cGMP-Level sind hier insensitive gegenüber Guanylin.

	GC-C-knock-out-Mäuse	Wildtyp-Mäuse
Kontrolle	100 % cGMP	100 % cGMP
Glukose (18 mM)	(101,6 ± 4,8) % cGMP	(97,7 ± 5,0) % cGMP
Guanylin (1 µM)	(124,2 ± 4,8) % cGMP	(32857,2 ± 2412,3) % cGMP

Tab. 11: Wertetabelle zu Abb. 19

cAMP-Freisetzung aus Langerhans'schen Inseln

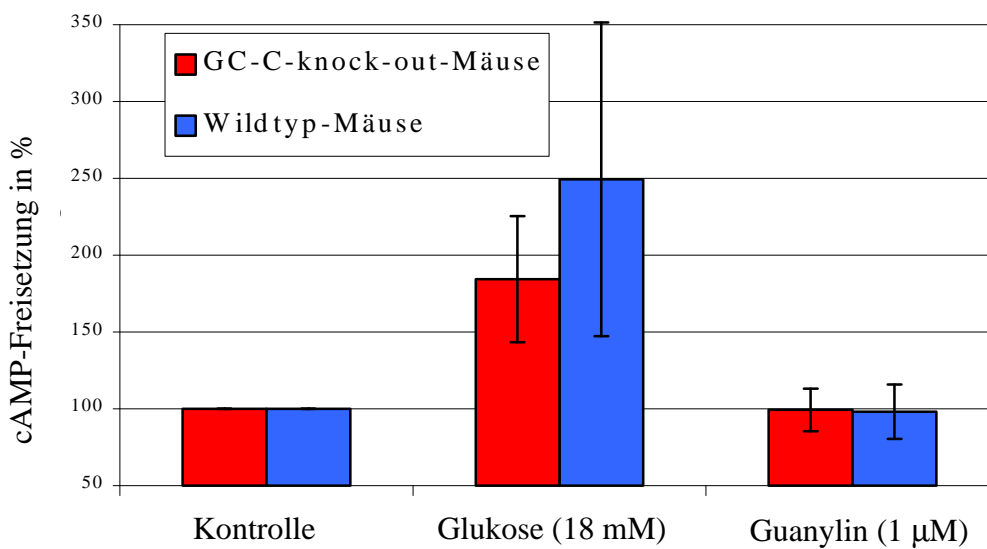


Abb. 20: Guanylin hat in Langerhans'schen Inseln der Maus keinerlei Einfluß auf die cAMP-Level. Durch Glukose werden die cAMP-Level erhöht. Dieser Effekt tritt bei Langerhans'schen Inseln aus GC-C knock-out- wie auch Wildtyp-Mäusen auf.

	GC-C-knock-out-Mäuse	Wildtyp-Mäuse
Kontrolle	100.00 % cAMP	100.00 % cAMP
Glukose (18 mM)	184.40 % cAMP	249.36 % cAMP
Guanylin (1 µM)	99.31 % cAMP	98.21 % cAMP

Tab. 12: Wertetabelle zu Abb. 20

4.3.7. Insulinfreisetzung aus INS-1-Zellen nach Applikation von 8-Br-cGMP

Die vorliegenden Ergebnisse aus den GC-C knock-out Mäusen legen nahe, daß cGMP in der Signaltransduktion vom Guanylin zum Insulin als *second messenger* fungiert. Eine Möglichkeit zur Untersuchung cGMP-abhängiger Effekte besteht in der Applikation von 8-Br-cGMP. 8-Br-cGMP ist physiologisch ein cGMP-Analog. Extrazelluläre Applikation führt so im Zytosol zu einer Imitation der cGMP-Freisetzung.

Der Einsatz des 8-Br-cGMP erfolgte in Inkubationsversuchen mit INS-1-Zellen. Es wurde festgestellt, daß 8-Br-cGMP dosisabhängig Insulin aus INS-1-Zellen freisetzt. Bei der Verwendung des 8-Br-cGMP der Firma SIGMA fiel auf, daß schon eine Applikation von 100 µM 8-Br-cGMP zu einer signifikanten Insulinfreisetzung führte. Für cGMP, das als Kontrolle eingesetzt war, konnte bei dieser Konzentration keine Aktivität festgestellt werden.

Die Aktivität von 8-Br-cGMP als insulinotroper Faktor in INS-1-Zellen verifiziert cGMP als *second messenger* zur Insulinfreisetzung. Im Folgenden stellte sich die Frage, auf welche Weise das freigesetzte cGMP die Insulinfreisetzung forciert.

4.3.8. Detektion cGMP-bindender Proteine im Western Blot

cGMP ist in eine Reihe von physiologischen Prozessen involviert. Im Rahmen früherer Untersuchungen wurde ein breites Spektrum von Proteinen charakterisiert, die durch cGMP aktiviert werden. Hierzu gehören die Proteinkinasen A und G (I und II) sowie 11 verschiedene Phosphodiesterasen (PDE). Unter den PDE sind die PDE 3 (A und B) sowie die PDE 5 relevant. Die beiden Formen der PDE 3 sind in diesem Falle besonders interessant, da sie cAMP abbauen und durch cGMP inhibiert werden. Sie eröffnen die Möglichkeit des "crosstalk" zwischen cGMP- und cAMP-abhängigen Signaltransduktionskaskaden. Die Proteinkinase G (auch PKG oder cGK) ist das klassische cGMP-bindende Protein. Die PKG I ist die lösliche Form; die PKG II ist möglicherweise membrangebunden. Bei höheren cGMP-Konzentrationen kommt es auch zur Aktivierung der cAMP-abhängigen

Proteinkinase (Proteinkinase A oder PKA). Die PKA ist über einen in der Einleitung beschriebenen cAMP-abhängigen Weg in die Insulinfreisetzung involviert.

In Proteinextrakten aus INS-1-Zellen wurden unter Verwendung spezifischer Antikörper im Western Blot folgende cGMP-bindenden Proteine nachgewiesen: cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGK-I oder PKG-I) und cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGK-II oder PKG-II). Die Phosphodiesterasen (PDE) II, IIIa und V konnten per Westernblot nicht detektiert werden.

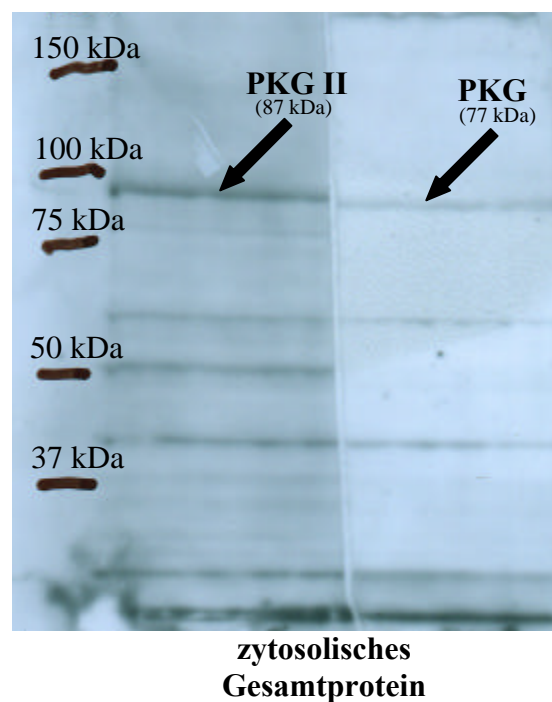


Abb. 21: Nachweis der PKG I und II in INS-1-Zellen mittels Western-Blot.

4.3.9. Insulinfreisetzung durch Guanylin nach Inhibition der Proteinkinase-G

Nach der Detektion der PKG im Western Blot sollte eine mögliche Bedeutung der PKG für die guanylinabhängige Insulinfreisetzung charakterisiert werden. Hierzu wurde ein spezifischer Inhibitor der PKG, das Rp-8-Br-PET-cGMPS [124, 125] eingesetzt.

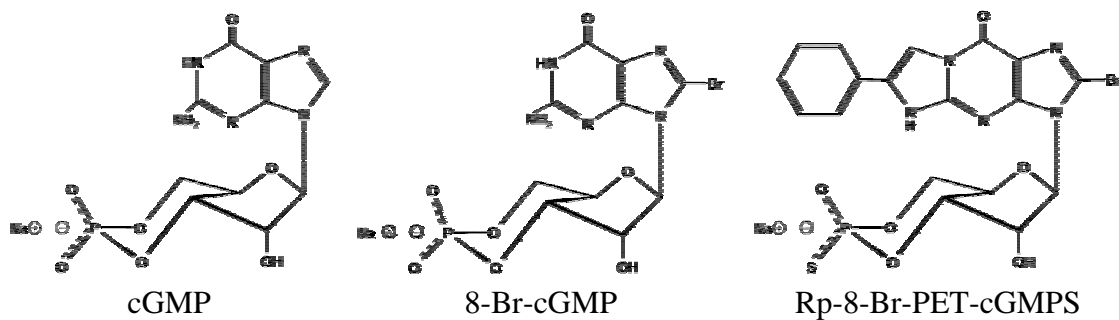


Abb. 22: Struktureller Vergleich des zyklischen Nucleotids cGMP und seiner membranpermeablen Äquivalente 8-Br-cGMP und Rp-8-Br-PET-cGMPS. Rp-8-Br-PET-cGMPS ist ein hochspezifischer Inhibitor der Proteinkinase G.

Die durchgeführten Experimente waren Inkubationsexperimente mit INS-1-Zellen. Die Zellen wurden mit Guanylin ($1 \mu\text{M}$) und verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors inkubiert. Zur Kontrolle wurde der gleiche Ansatz des Inhibitors unter Verwendung von 18 mM Glukose als insulinotropher Faktor untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß die glukoseabhängige Insulinfreisetzung nicht PKG-abhängig ist. Der Inhibitor hatte in diesem Fall keinen signifikanten Effekt. Der sichtbare Effekt wird auf inhibitorische Einflüsse von Rp-8-Br-PET-cGMPS auf die PKA zurückgeführt. Die guanylininduzierte Insulinfreisetzung konnte durch die Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Rp-8-Br-PET-cGMPS um 50% inhibiert werden.

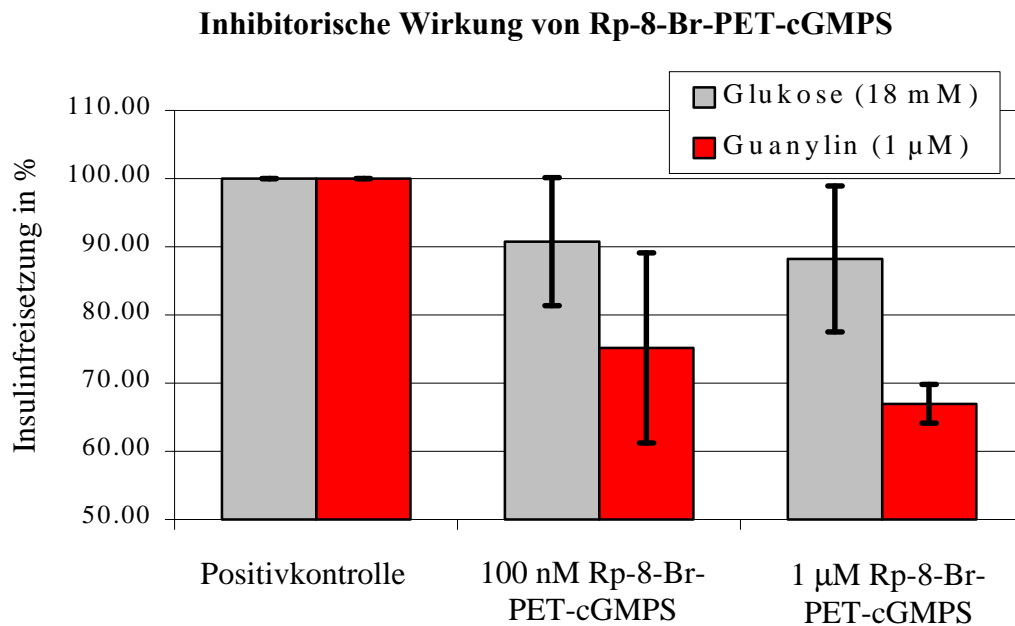


Abb. 23: Die inhibitorische Wirkung von Rp-8-Br-PET-cGMPS zeigt sich bei Konzentrationen von 1 µM nur bei der guanylinabhängigen Insulinfreisetzung. Aus diesen Inkubationsexperimenten mit INS-1-Zellen geht hervor, daß die PKG in die Insulinsekretion nach Guanylingabe involviert ist.

	Glukose (18 mM)		Guanylin (1 µM)	
	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
Positivkontrolle	100.00		100.00	
100 nM Rp-8-Br-PET-cGMPS	90.75	9.40	75.16	13.95
1 µM Rp-8-Br-PET-cGMPS	88.20	10.70	66.97	2.85
Werte in % Insulinfreisetzung				

Tab. 13: Wertetabelle zu Abb. 23

4.3.10. Einfluß von Guanylin auf die zytosolische Ca^{++} -Konzentration

Wie in der Einleitung dargestellt, geht jeder bekannten Form der Insulinfreisetzung eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumspiegel voraus. Im Folgenden sollte

untersucht werden, ob eine solche Kalziumanreicherung auch nach der Gabe von Guanylin zu detektieren ist. Hierzu wurden die zytosolischen Kalziumlevel von INS-1-Zellen an der hauseigenen Kalziummaßanlage detektiert. Zur Negativkontrolle diente Puffer; als Positivkontrolle wurde 20 %-iges FCS appliziert. Untersucht wurde die Reaktion der Zellen auf Applikation von 18 mM Glukose und 1 μ M Guanylin.

Messung zytosolischer Kalziumlevel an INS-1-Zellen

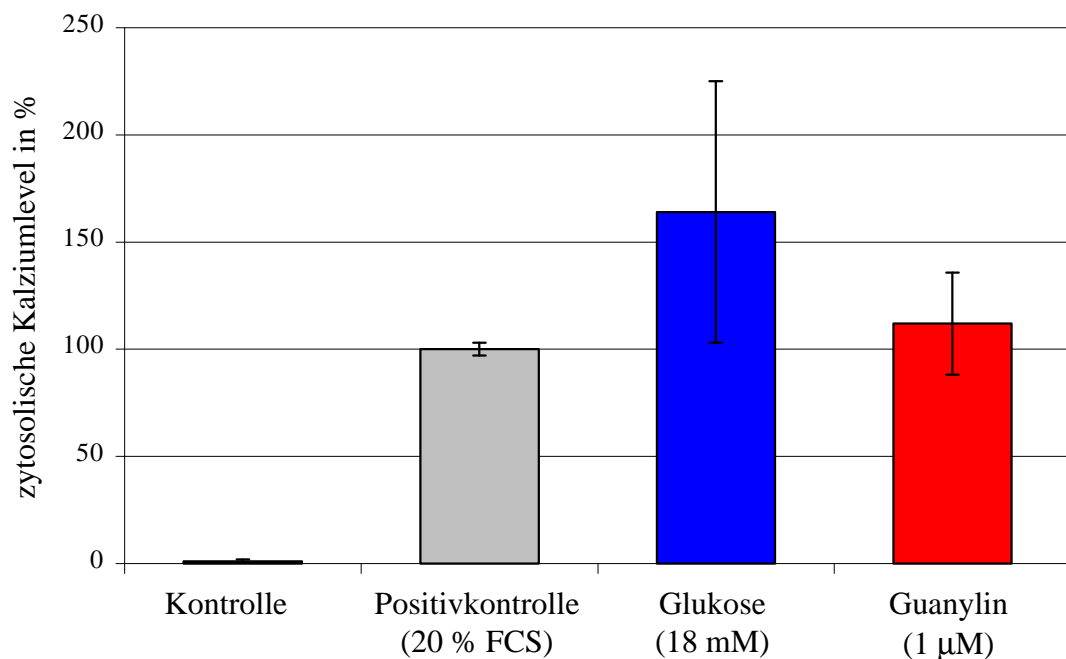


Abb. 24: Wie auch die Positivkontrolle FCS, lösen Glukose und Guanylin in den beschriebenen Konzentrationen einen zytoplasmatischen Anstieg der Kalziumkonzentration aus. Die drei gezeigten Effekte sind quantitativ vergleichbar, d.h. sie unterscheiden sich nicht signifikant.

	Mittelwert	Standardabweichung
Negativkontrolle	1,1	0,9
Positivkontrolle (20% FCS)	100,0	3,1
Glukose (18 mM)	164,5	61,0
Guanylin (1 μ M)	111,9	23,8
Werte in % zytosolischer Kalziumkonzentration		

Tab. 14: Wertetabelle zu Abb. 24

Wie erwartet löst Glukose einen Kalziuminflux in das Zytosol aus. Aus diesem Experiment geht hervor, daß auch Guanylin einen solchen Effekt ausübt. Die verschiedenen, cAMP- bzw. cGMP-regulierten Signaltransduktionskaskaden, vereinigen sich also spätestens bei der zytosolischen Kalziumakkumulation.

4.3.11. Einfluß von Guanylin in Verbindung mit Rp-8-Br-PET-cGMPS auf die zytosolische Ca^{++} -Konzentration

Durch die nachgewiesene Regulation des zytosolischen Kalziumspiegels wurde es möglich, bisher nur auf Basis der Insulinmessung erbrachte Ergebnisse in diesem Meßverfahren zu verifizieren. Die Inhibition der guanylinabhängigen Insulinfreisetzung durch Rp-8-Br-PET-cGMPS konnte auf die Auswirkungen auf die Kalziumspiegel hin untersucht werden. Das Experiment wurde ähnlich, wie das im vorhergehenden Kapitel beschriebene, durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde ebenfalls 20 %-iges FCS eingesetzt. Die Messungen erfolgten allerdings bei Perifusion mit 1 μ M Rp-8-Br-PET-cGMPS. Somit fanden die Messungen bei inhibierter PKG statt.

Inhibitorische Wirkung von Rp-8-Br-PET-cGMPS auf zytosolische Kalziumlevel an INS-1-Zellen

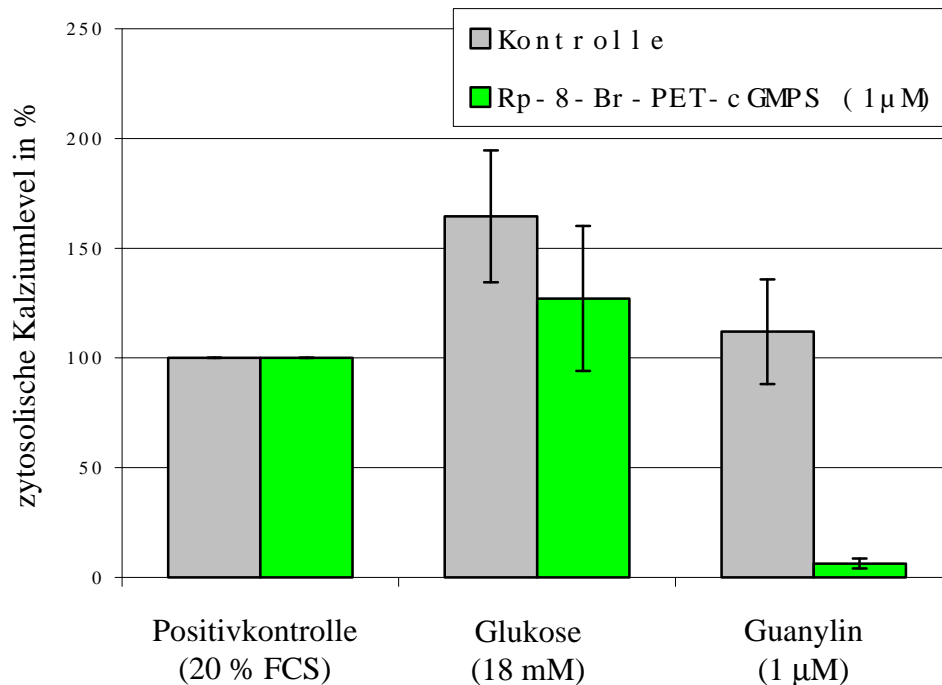


Abb. 25: Die guanylininduzierte Erhöhung zytosolischer Kalziumspiegel läßt sich durch 1 µM Rp-8-Br-PET-cGMPS vollständig inhibieren. Auf glukoseinduzierte Kalziumeffekte hat Rp-8-Br-PET-cGMPS keinen signifikanten Einfluß. Der sichtbare, unsignifikante Effekt ist vermutlich auf Kreuzreaktionen des Inhibitors mit der PKA zurückzuführen.

	20% FCS	Glukose (18 mM)		Guanylin(1µM)	
		Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung
Kontrolle	100	164,6	30,0	127,1	23,9
Rp-8-Br-PET-cGMPS (1µM)	100	112,0	33,0	6,3	2,3

Werte in % zytosolischer Kalziumkonzentration

Tab. 15: Wertetabelle zu Abb. 25

Der guanylinabhängige Kalziumeffekt wird durch die Inhibition der PKG nahezu vollständig unterdrückt. Der glukoseabhängige Effekt hingegen zeigt keine signifikante Abhängigkeit von der PKG. Somit läßt sich bestätigen, daß die PKG für

den Kalziumanstieg nach Guanylingabe verantwortlich ist. Zur Charakterisierung derjenigen Kalziumeffekte, die der PKG-Aktivierung nachfolgen, wurden Versuche mit dem spezifischen Inhibitor des ATP-sensitiven Kaliumkanals Glibenclamid durchgeführt.

4.3.12. Einfluß von Guanylin in Verbindung mit Glibenclamid auf die zytosolische Ca^{++} -Konzentration

Nachdem geklärt war, daß die guanylininduzierte Insulinfreisetzung eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration einschließt, galt das Augenmerk dem Ursprung der freigesetzten Kalziumionen. Grundsätzlich kommen zwei verschiedene Quellen in Frage: der extrazelluläre Raum und intrazelluläre Speicher wie das ER. In Experimenten wurde die Zytoplasmamembran von INS-1-Zellen mit Hilfe von Glibenclamid depolarisiert. Glibenclamid (1 μM) schließt die ATP-abhängigen Kaliumkanäle. Durch den passiven Kaliumefflux und die damit einhergehende Depolarisierung der Zytoplasmamembran kommt es zur Öffnung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle und zum Einstrom von Kalziumionen aus dem Extrazellularraum. Bei nachfolgender Applikation Guanylins gäbe eine weitere Erhöhung der zytosolischen Kalziumspiegel ein Hinweis darauf, daß intrazelluläre Kalziumspeicher für die Insulinfreisetzung verantwortlich sind. Eine Positivkontrolle konnte mit 1 μM Thapsigargin durchgeführt werden. Diese Substanz dringt in die Zellen ein und entleert die intrazellulären Kalziumspeicher. Die durchgeführten Experimente liefern keinen Hinweis darauf, daß intrazelluläre Kalziumspeicher in diese Form der Insulinfreisetzung involviert sind. Guanylin konnte nach Depolarisation der Zytoplasmamembran keinen weiteren Kalziumanstieg im Zytoplasma hervorrufen. Die guanylininduzierte Insulinfreisetzung ist somit von extrazellulärem Kalzium abhängig.

4.4. Regulation des Insulins durch Guanylatzyklase-Aktivierung?

In Zusammenhang mit Glukose wurde eine Regulation Insulins auf transkriptorischer Ebene diskutiert. In Experimenten hierzu wurde jedoch stets ein Promotor des

Insulins und nicht das Gen selbst betrachtet. Es wurde eine Hochregulation dieses Promotors drei bis sechs Stunden nach Glukoseapplikation beobachtet. Dieser Versuch sollte im Rahmen des Projektes auch mit Guanylin durchgeführt werden. Es wurden TaqMan-Experimente an INS-1-Zellen durchgeführt. Nach verschieden langer Inkubation der Zellen mit Guanylin (1 μ M) bzw. verschiedenen Konzentrationen Glukose wurde die RNA isoliert und der TaqMan-real-time-PCR unterzogen.

Expressionsregulation von Insulin in INS-1-Zellen

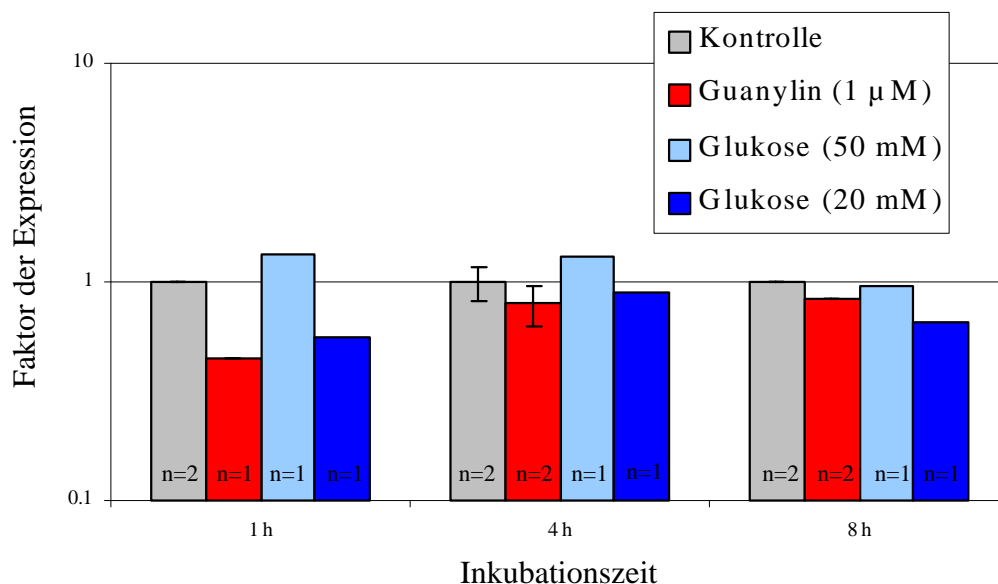


Abb. 26: Guanylin reguliert die Insulinexpression nicht hoch. Gleiches läßt sich für Glukose in den Konzentrationen von 20 mM und 50 mM sagen. Ein nennenswerter Einfluß auf die Expression kann bei keiner der beiden Substanzen festgestellt werden.

	Inkubationszeit: 1 h	Inkubationszeit: 4 h	Inkubationszeit: 8 h
Kontrolle	1	1	1
Guanylin (1 μ M)	0,45	0,79	0,84
Glukose (50 mM)	1,40	1,32	0,95
Glukose (20mM)	0,51	0,89	0,65

Tab. 16: Wertetabelle zu Abb. 26. Die Werte geben den Faktor der Transkription im Vergleich zum Kontrollwert wieder.

Aus den Experimenten geht hervor, daß Guanylin keinen positiven regulatorischen Effekt auf die Insulintranskription ausübt. Ebenso ist für Glukose keine hochregulierende Wirkung nachweisbar. Diese Aussage bezieht sich auf ein Exon des Insulingens und nicht auf den Promotor.

5. Diskussion

5.1. Allgemeines zum Guanylin-GC-C-System der pankreatischen β -Zelle

Ziel der vorliegenden Arbeit war die physiologische Charakterisierung der GC-C der pankreatischen β -Zelle. Mit Beschreibung der Signaltransduktionskaskade vom Zeitpunkt der Aktivierung der GC-C durch Guanylin bis zur Ausschüttung von Insulin konnte eindeutig eine Funktion des Guanylin-GC-C-Systems in der β -Zelle nachgewiesen werden. Lediglich ein Schritt der Signaltransduktion bleibt offen. Damit kann in der Langerhans'schen Insel von einem parakrinen Wirkmechanismus von der α -Zelle zur β -Zelle ausgegangen werden. Welche Bedeutung diese parakrine Beziehung besitzt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden, u.a. durch Einkreuzen des GC-C-knock-out in diabetische Mäuse.

An pankreatischen β -Zellen (INS-1) konnte gezeigt werden, daß die Applikation von Guanylin, einem endogenen Liganden der GC-C, in Konzentrationen ab 1 μ M zur Freisetzung von Insulin führt. Auch die anderen bekannten Liganden der GC-C Uroguanylin und STa zeigen diesen Effekt. Bei STa ist ein signifikanter Effekt schon bei 100 nM zu beobachten.

Im nächsten Schritt sollte nachgewiesen werden, daß der beobachtete Effekt der Agonisten der GC-C auch tatsächlich über diesen Rezeptor vermittelt wird. Hierzu wurde das Modell der GC-C-knock-out-Maus herangezogen. An isolierten Langerhans'schen Inseln dieser Tiere konnte gezeigt werden, daß GC-C-defiziente Inseln insensitiv gegenüber Guanylin sind. In Kontrollexperimenten mit Langerhans'schen Inseln aus Wildtyp-Mäusen hingegen konnte eine insulinotrophe Aktivität von Guanylin gezeigt werden. Diese Daten belegen, daß im beschriebenen System die GC-C essentiell für die Signaltransduktion vom Guanylin zur Insulinfreisetzung ist. In Kontrollexperimenten an den Langerhans'schen Inseln konnte gezeigt werden, daß der knock-out der GC-C keinerlei Einfluß auf die

insulinotrophe Wirkung von Glukose (18 mM) hat. Im Wildtyp wie auch im knock-out führte Glukose (18 mM) zur Insulinfreisetzung.

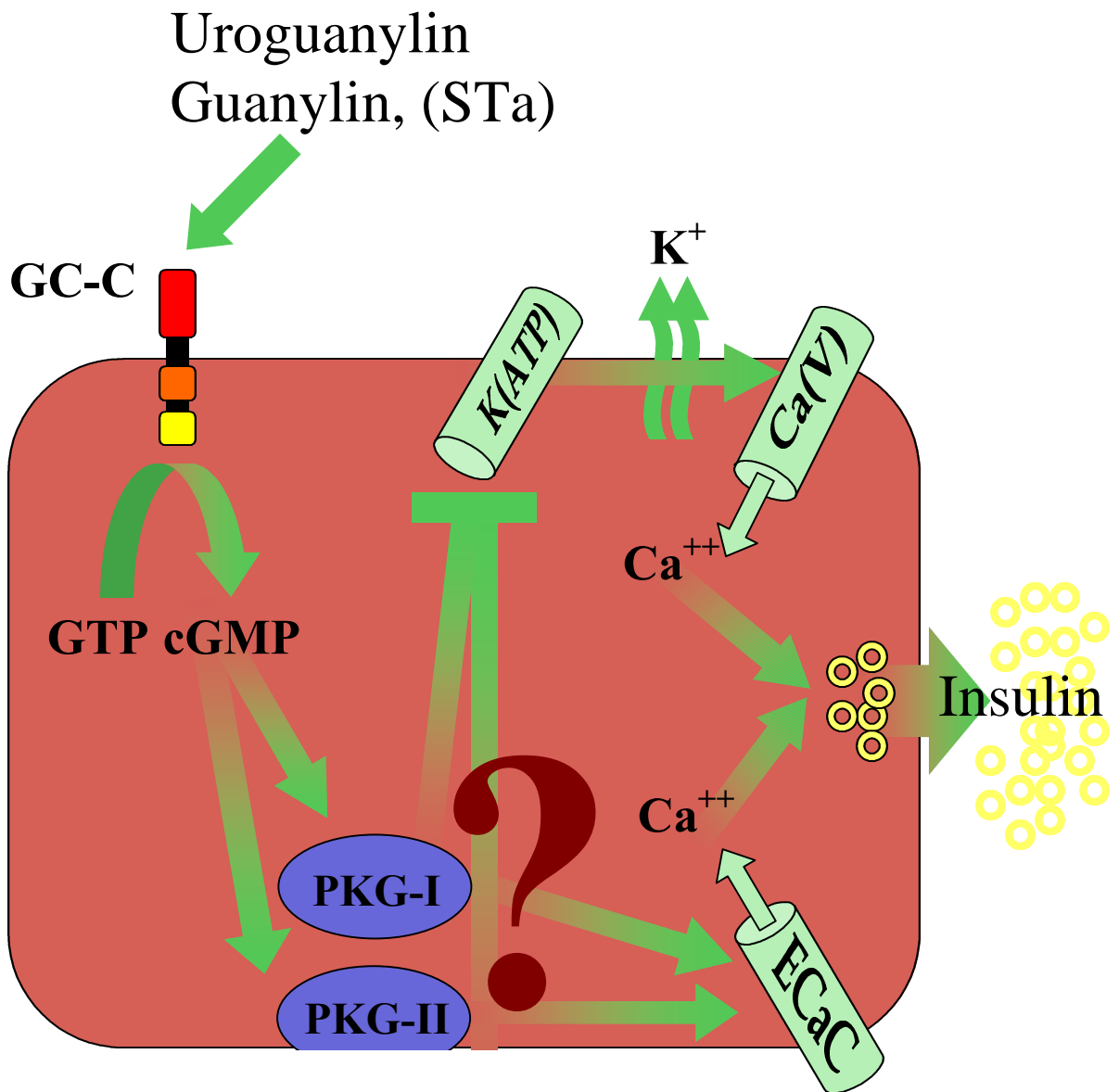
Als katalytische Aktivität der GC-C ist die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) beschrieben. Zur Verifizierung cGMPs als *second messenger* der untersuchten Signaltransduktionskaskade wurde seine Konzentration nach Stimulation von INS-1-Zellen mit Guanylin gemessen. Es stellte sich heraus, daß Guanylin zu einer Erhöhung der cGMP-Level führt. Für Glukose konnte ein Effekt auf cGMP nicht festgestellt werden. Durch Glukose wurden die zytosolischen cAMP-Level signifikant erhöht. Guanylin hatte keinen Einfluß auf cAMP. Diese Ergebnisse legen nahe, daß Guanylin und Glukose auf voneinander weitestgehend getrennten Wegen Insulin freisetzen. Um diese These zu verifizieren wurde überprüft, ob die insulinotropen Effekte von Guanylin (1 µM) und Glukose (18 mM) additiv sind. Die Ergebnisse zeigen eine Additivität der etwa gleich starken Effekte. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt des Projektes eine guanylinabhängige Insulinfreisetzung über die GC-C und cGMP, die getrennt von der glukoseabhängigen Insulinfreisetzung abläuft. Wenn cGMP in die Signaltransduktion involviert ist, sollte auch eine zytosolische Applikation von cGMP zur Insulinfreisetzung führen. Experimente hierzu wurden mit Hilfe des cGMP-Analogen 8-Br-cGMP durchgeführt. In INS-1-Zellen führt die Applikation 8-Br-cGMP zur Insulinfreisetzung.

Somit begann die Suche nach dem Folgeschritt in der Signaltransduktionskaskade. Im Western-Blot wurde das Proteom von INS-1-Zellen auf die Expression verschiedener cGMP-bindender Proteine untersucht. Es wurden die Phosphodiesterasen II, IIIa und V sowie die cGMP-abhängigen Proteinkinasen I und II betrachtet. Im Gegensatz zu beiden Proteinkinasen konnte keine der drei Phosphodiesterasen nachgewiesen werden, was insofern zu erwarten war, als daß diese Phosphodiesterasen den *cyclic nucleotide crosstalk* (in separatem Kapitel diskutiert) unterstützen. Dieser kann jedoch durch die Messungen von cAMP und cGMP auf Ebene der Phosphodiesterasen ausgeschlossen werden. So bleiben als Zielproteine des cGMP die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG) I und II. Ihre Validierung in der untersuchten Signaltransduktionskaskade wird durch den

spezifischen Inhibitor Rp-8-Br-PET-cGMPS möglich. In Inkubationsexperimenten konnte gezeigt werden, daß Rp-8-Br-PET-cGMPS die guanylinabhängige Insulinfreisetzung inhibiert. Ein Einfluß auf die glukoseabhängige Insulinfreisetzung besteht erst bei 100-fach höheren Konzentrationen. Dieser Effekt läßt sich auf die Kreuzinhibition der cAMP-abhängigen Proteinkinase durch Rp-8-Br-PET-cGMPS bei höheren Konzentrationen zurückführen. Ein direkter Wirkmechanismus der PKG konnte im weiteren Verlauf des Projektes nicht dargestellt werden. Es bot sich jedoch die Möglichkeit, sich von nun an "rückwärts" durch die Signaltransduktionskaskade zu arbeiten. Es bestand also die Aufgabe, den der Insulinfreisetzung direkt vorgeschalteten Effekt zu charakterisieren. In allen, noch so verschiedenen Mechanismen der Insulinfreisetzung ist dies ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration. Experimentell konnte an INS-1-Zellen festgestellt werden, daß Guanylin genau wie Glukose zu einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration führt. Ebenfalls wurde gezeigt, daß Rp-8-Br-PET-cGMPS den Effekt Guanylins auf die Kalzium-Level inhibiert. Der glukoseabhängige Effekt bleibt auch hierbei unbeeinflußt.

Im folgenden stellt sich die Frage, woher das Kalzium ins Zytosol strömt. Hierfür kommen grob betrachtet zwei Quellen in Frage: der Extrazellularraum (Einstrom über die Zytoplasmamembran) und intrazelluläre Kalziumspeicher. Im Experiment wurde der Extrazellularraum als Kalziumdonor ausgeschlossen. Im Gegensatz zur Positivkontrolle Thapsigargin (1 μ M) führte Guanylin unter diesen Bedingungen nicht zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalzium-Level. Somit steht fest, daß der Extrazellularraum als Kalziumquelle essentiell ist und Kalziumkanäle der Zytoplasmamembran involviert sein müssen. Eine ausreichende Ionenflußrate kommt nur für zwei Kalziumkanaltypen in Frage: die spannungsabhängigen Kalziumkanäle und die erst 1999 beschriebenen epithelialen Kalziumkanäle (ECaC I und II), die in pankreatischen β -Zellen hochexprimiert sind (persönliche Information von Rene Bindels, Department of Cell Physiology, University of Nijmegen, The Netherlands). Die ECaC konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden. Die Aktivatoren und Inhibitoren dieser Kanäle sind noch nicht umfassend charakterisiert. Vom spannungsabhängigen Kalziumkanal (Ca_v -Kanal) ist bekannt, daß er in die glukoseabhängige Insulinsekretion involviert ist. Im Falle von

Glukose wird über cAMP und die cAMP-abhängige Proteinkinase der ATP-abhängige Kaliumkanal inhibiert. Dieser sorgt im aktiven Zustand für einen Ausgleich des passiven Kaliumionenefflux über die Zytoplasmamembran. Ist der Kanal inaktiv, kommt es zu einer Depolarisation der Zytoplasmamembran. Angefangen beim Normalwert von -80 mV erreicht das Membranpotential den Wert von -40 mV. Durch diesen Spannungsabfall öffnen sich die spannungsabhängigen Kalziumeinwärtsleiter und führen zum Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration. In direkter Folge wird Insulin sezerniert. Keiner der beiden Signaltransduktionswege, K_{ATP} -Kanal \rightarrow Ca_v -Kanal und EcaC, läßt sich für die guanylinabhängige Insulinfreisetzung ausschließen. Im folgenden zusammenfassenden Schema der Signaltransduktion (Abb. 27) sind deshalb beide Wege dargestellt.



Pankreatische β -Zelle

Abb. 27: Zusammenfassende Darstellung der Signaltransduktionskette vom Guanylin bis zur Insulinfreisetzung aus der pankreatischen β -Zelle. Spezifische endogene Liganden (Guanylin, Uroguanylin) binden an die Guanylatzyklase C (GC-C) und aktivieren sie. Die GC-C katalysiert die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). cGMP seinerseits aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) Typ I und II. In einem weiteren Schritt induziert die PKG den Einstrom von Kalziumionen aus dem Extrazellularraum. Dieser Schritt könnte die Inhibition des ATP-abhängigen Kaliumkanals [$K_{(ATP)}$] oder die Aktivierung von epithelialen Kalziumkanälen (ECaC) sein. Die ECaC führen direkt zu einem Kalziumeinstrom. In der K_{ATP} -Kanal-abhängigen Signaltransduktion kommt es erst zu einer Depolarisation der Zytoplasmamembran und nachfolgend zum Öffnen der spannungsabhängigen Kalziumkanäle [$Ca(V)$]. Die Exozytose der Insulingranula ist eine direkte Folge der erhöhten zytosolischen Kalziumspiegel.

5.2. Phänotyp der GC-C-knock-out-Mäuse

5.7.1. Veränderungen des Elektrolyt-Haushaltes

Bei GC-C-knock-out-Mäusen konnten signifikante Veränderungen des Elektrolythaushaltes festgestellt werden. Die Kalziumausscheidung über den Kot wie auch die Kalziurese sind in GC-C-knock-out-Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen erhöht. Die Natriumausscheidung über den Kot hingegen ist signifikant herabgesetzt. Durch das ständig natürlich im Darm vorkommende Guanylin wird die intestinale GC-C permanent basal aktiviert. Wie in Abb. 4 dargestellt, kommt es in der intestinalen Epithelzelle dadurch über die Ausschüttung von Chlorid-Ionen zum Efflux von Natrium-Ionen über die Zytoplasmamembran ins Darmlumen. Die GC-C forciert also in diesem Fall die Natriumausscheidung. Bei Fehlen der GC-C im Modell des GC-C-knock-out wird zwar die Chlorid-Ionen-Ausscheidung vollständig durch andere Freisetzungsmechanismen kompensiert, die Ausscheidung von Natrium-Ionen über den Kot kann hingegen nicht vollständig ausgeglichen werden.

5.7.2. Herabsetzung der Glukosetoleranz durch Fehlen der GC-C

Die erzielten Ergebnisse sind ein weiterer Beleg dafür, daß es sich beim Insulin-Hormonsystem um ein höchst integriertes System handelt. Im Rahmen der Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß Guanylin über die GC-C in pankreatischen β -Zellen zu einer Insulinfreisetzung führt. Dieser Befund wurde nicht nur im Modell der INS-1-Zellen, sondern auch auf der Stufe der Langerhans'schen Inseln gefunden. Das Modell der GC-C-knock-out-Mäuse bot die naturnaheste Möglichkeit, die Bedeutung der GC-C für die Insulinfreisetzung zu charakterisieren. Bei der Bestimmung der oralen Glukosetoleranz, einem sehr speziellen und genauen Test, konnte die insulinotrophe Wirkung der GC-C *in vivo* bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, daß GC-C-knock-out-Mäuse auf orale Glukoseapplikation schwächer reagieren als entsprechende Wildtyp-Mäuse. Der Blutglukosespiegel der GC-C-knock-out-Mäuse steigt direkt nach der Applikation höher als der von Wildtyp-Mäusen. Im weiteren Verlauf sinkt er zudem langsamer wieder ab. Dieser

eindeutige Befund setzt sich jedoch makroskopisch nicht fort. Äußerlich tritt bei den GC-C-knockout-Mäusen kein Phänotyp auf. Das heißt, der gesamte Effekt durch Wegfall, gerade der GC-C der pankreatischen β -Zelle, kann von den Mäusen kompensiert werden. Gleichmaßen legt die große physiologische Bedeutung von Insulin einen in alle Richtungen kompensierbare Regulation nahe.

5.3. Die Signaltransduktion von Guanylin zum Insulin

5.3.1. Wirkung von 8-Br-cGMP

8-Br-cGMP ist ein membranpermeables cGMP-Analog. Das heißt, es erfüllt die gleichen physiologischen Funktionen, kann jedoch durch seinen Substituenten Brom leichter die Zytoplasmamembran durchtreten. Um physiologisch wirksame intrazelluläre Konzentrationen zu erreichen, muß 8-Br-cGMP extrazellulär im Überschuß vorliegen, da die Zytoplasmamembran natürlich nach wie vor eine Diffusionsbarriere darstellt. Als wirksame Applikationskonzentration hat sich in einer Vielzahl von Publikationen 1 mM 8-Br-cGMP erwiesen [126], [127]. In Experimenten an INS-1-Zellen mit 8-Br-cGMP der Firma Sigma lag ein signifikanter insulinotropher Effekt schon bei Applikationskonzentrationen von weit unter 100 μ M (beginnend bei 10 μ M) vor. Dies kann ein Zeichen für hohe Sensivität der INS-1-Zellen gegenüber 8-Br-cGMP sein. Viel wahrscheinlicher ist jedoch eine physiologisch aktive Verunreinigung des cGMP-Analogs. Die mit 8-Br-cGMP erzielten Ergebnisse sollten deshalb nicht überbewertet werden.

5.3.2. "Cyclic nucleotide crosstalk" - in β -Zellen nicht nachweisbar

"Cyclic nucleotide crosstalk" beschreibt die Möglichkeit der Interaktion zwischen den Signaltransduktionswegen von cAMP und cGMP. Grundsätzlich bestehen vier Ebenen, auf denen sich die beiden Signaltransduktionswege gegenseitig beeinflussen können. Der erste und wohl bedeutendste Weg ist die Inhibition oder Aktivierung des Abbaus des jeweils anderen zyklischen Nukleotides. Zyklische Nukleotide werden durch Phosphodiesterasen degradiert. Steigen beispielsweise die cGMP-Level in

einer glatten Muskelzelle, wird dadurch die PDE-3 inhibiert. Die in Folge steigenden cAMP-Level bewirken eine Erschlaffung und damit Vasodilatation. Die zweite Möglichkeit des „*crosstalk*“ wird in der Beeinflussung der Synthese des jeweiligen Gegenspielers gesehen. Die dritte Möglichkeit stellen die "spezifisch" aktivierbaren Proteinkinasen A und G dar. Es wurde wiederholt diskutiert, daß sowohl cAMP die PKG als auch cGMP die PKA aktiviert. Gerichtete Effekte diesbezüglich könnten über das Konzentrationsverhältnis PKA/PKG reguliert sein. Als vierte Möglichkeit wird vorsichtig spekuliert, daß die Kompartimentierung (a) der die zyklischen Nukleotide synthetisierenden und degradierenden Proteine, (b) der Proteinkinasen A und G und (c) der Substrate dieser Kinasen eine regulatorische Funktion im "*crosstalk*" übernehmen könnte.

Im Zusammenhang mit der Problematik dieser Arbeit sind Effekte von Interesse, die von cGMP aus die cAMP-Signaltransduktionskette beeinflussen. Punkt (a) ist mit Sicherheit der bedeutendste Faktor im "*crosstalk*". Effekte von cGMP auf die Synthese von cAMP sind allerdings nicht beschrieben. Die Inhibition und Stimulation der Degradation von cAMP durch erhöhte cGMP-Level wurde hingegen schon in mehreren Geweben beschrieben. Dabei sind die Effekte von PDE II und PDE III antagonistisch. Beide PDE sind cGMP-abhängig. Die PDE II wird durch cGMP stimuliert, die PDE III wird dagegen durch cGMP inhibiert [128]. Eine Aktivierung der PDE II ist im Falle der guanylininduzierten Insulinsekretion unwahrscheinlich. Dieser Effekt wäre antagonistisch gegenüber dem von cGMP selbst hervorgerufenen Effekt - der Freisetzung Insulins. Vielmehr denkbar wäre eine Inhibition der PDE III. Die sich durch den verminderten Abbau erhöhenden cAMP-Level könnten über die Aktivierung der PKA und nachfolgend die Inhibition des ATP-abhängigen Kaliumkanals zur Insulinsekretion beitragen. Im Western-Blot konnte jedoch für das β -Zellmodell der INS-1-Zellen keine PDE III detektiert werden. Diese Möglichkeit des "*cyclic nucleotide crosstalk*" entfällt also im untersuchten Modell. Die Irrelevanz der PDE III für die cAMP- und die cGMP-abhängige Insulinsekretion konnte auch auf physiologischer Ebene nachgewiesen werden. In Versuchen mit Langerhans'schen Inseln aus Mäusen konnte nach Guanylinapplikation und der nachfolgend detektierten Erhöhung der cGMP-Level kein Anstieg des zytosolischen cAMP gemessen werden. Umgekehrt hatte die

Applikation von Glukose trotz nachfolgender cAMP-Erhöhung keinen Einfluß auf die zytosolischen cGMP-Level.

5.3.3. Die Aktivierung der PKG führt zur zytosolischen Kalziumanreicherung

Direkte Effekte der PKG auf zytosolische Kalziumlevel werden in der Literatur seit langem diskutiert. Ein beteiligtes System ist der Kalziumspeicher ER im Zusammenhang mit Inositol-(1,3,4)-triphosphat (IP₃). In glatten Muskelzellen moduliert die PKG auf diese Weise eine Absenkung des zytosolischen Kalziumspiegels [129]. Desweiteren wurde eine Absenkung des zytosolischen Kalziumspiegels mittels VASP in Endothelzellen beschrieben [130]. L-Typ Kalziumkanäle werden in Kardiomyozyten durch hohe zytosolische Kalziumkonzentrationen inhibiert [130]. Keiner dieser Effekte unterstützt die im Ergebnisteil dieser Arbeit getroffenen Aussagen.

Für die Gesamtheit der intrazellulären Kalziumquellen konnte im Rahmen der Arbeit gezeigt werden, daß diese nicht maßgeblich an der Kinetik der guanylininduzierten Kalziumanreicherung des Zytosols beteiligt sind. Durch knock-out der Kalziumkanalaktivität in der Zytoplasmamembran mittels Glibenclamid konnten rein intrazelluläre Kalziumeffekte betrachtet werden. Unter diesen Bedingungen wurden keine guanylinabhängigen Kalziumeffekte detektiert. Daß die untersuchten INS-1-Zellen zu rein intrazellulären Kalziumantworten fähig waren konnte mit Thapsigargin nachgewiesen werden. Dieses Experiment weist darauf hin, daß die PKG-induzierte Regulation des zytoplasmatischen Kalziumspiegels von der Zytoplasmamembran unterstützt wird. In der Zytoplasmamembran gibt es diverse Faktoren, die einen Kalziumioneneinstrom bewirken könnten. "*Cyclic nucleotide gated channels*" (CNG-Kanäle) sind Kalziumeinwärtsgleichrichter und werden durch zyklische Nukleotide, also cAMP und cGMP, gesteuert. Eine physiologische Bedeutung dieser Kanäle in pankreatischen β -Zellen ist durchaus denkbar. Allerdings setzt sich der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Effekt vom cGMP über die PKG fort und läuft so primär an den CNG-Kanälen vorbei. Die zwei verbleibenden Faktoren sind die Aktivierung der spannungsabhängigen

Kalziumkanäle nach Inhibition der ATP-abhängigen Kaliumkanäle und die erst in jüngster Vergangenheit beschriebenen endothelialen Kalziumkanäle (ECaC) 1 und 2. Für die direkte Inhibition des ATP-abhängigen Kaliumkanals durch die PKG müßte eine Phosphorylierung stattfinden. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde eine Abfrage in einem internetgestützten Phosphorylierungsstellenprogramm durchgeführt. Anhand der Aminosäuresequenzen wurde überprüft, ob die PKG den ATP-abhängigen Kaliumkanal phosphorylieren kann. Das Ergebnis ist naturgemäß vorläufig, fiel jedoch eindeutig aus: die PKG kann den ATP-abhängigen Kaliumkanal nicht phosphorylieren. Eine Klärung der Frage, ob der ATP-abhängige Kaliumkanal in die guanylininduzierte Insulinsekretion involviert ist, wäre mit einem Aktivator des ATP-abhängigen Kaliumkanals möglich. Leider ist derzeit kein hochselektiver Agonist des ATP-abhängigen Kaliumkanals verfügbar. Somit kann der Schritt von der PKG zur Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration in der untersuchten Signaltransduktionskette derzeit nicht charakterisiert werden. Neben dem ATP-abhängigen Kaliumkanal kommt für diesen Schritt der Signalvermittlung auch der 1999 von der Arbeitsgruppe Bindels (Bindels RJ, Department of Cell Physiology, University of Nijmegen, The Netherlands) beschriebene epitheliale Kalziumkanal (ECaC) Typ 1 und 2 in Frage.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Wedel BJ, Garbers DL: New insights on the functions of the guanylyl cyclase receptors. *FEBS Lett.* 1997, 410: 29-33
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9247117&dopt=Abstract
- 2 Garbers DL: Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine and autocrine ligands. *Cell* 1992, 71: 1-4
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1356629&dopt=Abstract
- 3 Yang RB, Foster, DC, Garbers, DL, Fülle, HJ: Two membrane forms of guanylyl cyclase forms found in the eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 602-606
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7831337&dopt=Abstract
- 4 Garbers DL: The guanylyl cyclase receptor family. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1991, 69: 1618-1621
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1685695&dopt=Abstract
- 5 Drewett DJ, Garbers DL: The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. *Endocr. Rev.* 1994, 15: 135-162
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7913014&dopt=Abstract
- 6 Schulz S, Green CK, Yuen PST, Garbers DL: Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 1990, 63: 941-948
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1701694&dopt=Abstract
- 7 Schulz S, Lopez MJ, Kuhn M, Garbers DL: Disruption of the guanylyl cyclase C gene leads to a paradoxical phenotype of viable but heat-stable enterotoxin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* 1997, 100 (6): 1590-1595
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9294128&dopt=Abstract
- 8 Mann EA, Jump ML, Wu J, Yee E, Gianella RA: Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to STa-induced intestinal secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 239 (2): 463-466
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9344852&dopt=Abstract
- 9 Laney DW, Mann EA, Dellon SC, Perkins DR, Gianella RA, Cohen MB: Novel sites of expression of an Escherichia coli heat-stable enterotoxin receptor in the developing rat. *Am. J. Physiol.* 1992, 263 (Gastrointest. Liver Physiol. 26): G816-G821
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1359797&dopt=Abstract
- 10 Li Z, Goy MF: Peptide-regulated guanylate cyclase pathways in rat colon: in situ localization of GCA, GCC, and guanylin mRNA. *Am. J. Physiol.* 1993, 265: G394-G402
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8103637&dopt=Abstract

- 11 Schulz S, Chrisman TD, Garbers DL: Cloning and expression of Guanylin; its existence in various mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 1992, 267 (23): 16019-16021
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1379587&dopt=Abstract
- 12 Forte LR, Krause WJ, Freeman RH: Escherichia coli enterotoxin receptors: localization in opossum kidney, intestine, and testis. *J. Am. Physiol.* 1989, 257 (26): F874-F881
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2556042&dopt=Abstract
- 13 Krause WJ, Freeman RH, Forte LR: Autoradiographic demonstration of specific binding sites for E. coli enterotoxin in various epithelia of the North American opossum. *Cell Tissue Res.* 1990, 260: 387-394
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2162736&dopt=Abstract
- 14 Field M, Graf LH Jr., Laird WJ, Smith PL: Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: *In vitro* effects on guanylate cyclase activity, cyclic cGMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, **75**: 2800-2804
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=26915&dopt=Abstract
- 15 Singh S, Singh G, Heim JM, Gerzer R.: Isolation and expression of a guanylate cyclase-coupled heat stable enterotoxin receptor cDNA from a human colonic cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991 Sep 30;179(3):1455-1463
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1718270&dopt=Abstract
- 16 Huott PA, Liu W, McRoberts JA, Giannella RA, Dharmasathaphorn K. Mechanism of action of Escherichia coli heat stable enterotoxin in a human colonic cell line. *J Clin Invest.* 1988 Aug;82(2):514-23
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2457034&dopt=Abstract
- 17 Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin K, Schmith CE: Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89: 947-951
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1346555&dopt=Abstract
- 18 Wiegand RC, Kato J, Currie MG: Rat guanylin cDNA: characterization of the precursor of an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, 185 (3): 812-817
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1378267&dopt=Abstract
- 19 Wiegand RC, Kato J, Huang MD, Fok KF, Kachur JF, Currie MG: Human guanylin: cDNA isolation, structure and activity. *FEBS Lett.* 1992, 311 (2): 150-154
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1327879&dopt=Abstract
- 20 De Sauvage FJ, Keshav S, Kuang WJ, Gillett N, Henzel W, Goeddel DV: Precursor structure, expression and tissue distribution of human guanylin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89: 9089-9093
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1409606&dopt=Abstract
- 21 Kato J, Wiegand RC, Currie MG: Characterization of the structure of preproguanylin. *Adv. Second Messenger and Phosphoprotein Research* 1993, 28: 139-143
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8398395&dopt=Abstract

- 22 D'Este L, Kulaksiz H, Rausch U, Vaccaro R, Wenger T, Tokunaga Y, Renda TG, Cetin Y: Expression of guanylin in "pars tuberalis-specific cells" and gonadotrophs of rat adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97(3):1131-1136
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10655496&dopt=Abstract
- 23 Lewis LG, Witte DP, Laney DW, Currie MG, Cohen MB: Guanylin mRNA is expressed in villous enterocytes of the rat small intestine and superficial epithelia of the rat colon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 196 (2): 553-560
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8240327&dopt=Abstract
- 24 Li Z, Taylor-Blake B, Light AR, Goy MF: Guanylin, an endogenous ligand for C-type guanylate cyclase, is produced by goblet cells in the rat intestine. *Gastroenterology* 1995, 109: 1863-1875
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7498651&dopt=Abstract
- 25 Kuhn M, Raida M, Adermann K, Schulz-Knappe P, Gerzer R, Heim JM, Forssmann WG: The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10,3 kDa). *FEBS Lett.* 1993, 318: 205-209
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8095028&dopt=Abstract
- 26 Hamra FK, Forte LR, Eber SL, Pidhorodeckyi NV, Krause WJ, Freeman RH, Chin DT, Tomkins JA, Fok KF, Smith CE, Duffin KL, Siegel NR, Currie MG: Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 10464-10468
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7902563&dopt=Abstract
- 27 Kita T, Smith CE, Fok KF, Duffin KL, Moore WM, Karabatsos PJ, Kachur JF, Hamra FK, Pidhorodeckyi NV, Forte LR, Currie MG: Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. *Am. J. Physiol.* 1994, 35: F342-F348
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8141334&dopt=Abstract
- 28 Hess R, Kuhn M, Schulz-Knappe P, Raida M, Fuchs M, Klodt J, Adermann K, Kaever V, Cetin Y, Forssmann WG: GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett.* 1995, 374: 34-38
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7589507&dopt=Abstract
- 29 Klodt J, Kuhn M, Marx U, Martin S, Rösch P, Forssmann WG, Adermann K: Synthesis, biological activity and isomerism of guanylate cyclase C-activating peptides guanylin and uroguanylin. *J. Peptide Res.* 1997, 50: 222-230
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9309586&dopt=Abstract
- 30 Miyazato M, Nakazato M, Yamaguchi H, Data Y, Kojima M, Kangawa K, Matsuo H, Matsukura S: Cloning and characterization of a cDNA encoding a precursor for human uroguanylin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 219: 644-648
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8605041&dopt=Abstract
- 31 Miyazato M, Nakazato M, Matsukura S, Kangawa K, Matsuo H: Uroguanylin gene expression in the alimentary tract and extra-gastrointestinal tissues. *FEBS Lett.* 1996, 398: 170-174
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8977100&dopt=Abstract

- 32 Whitaker TL, Witte DP, Scott MC, Cohen MB: Uroguanylin and guanylin: distinct but overlapping patterns of messenger RNA expression in mouse intestine. *Gastroenterology* 1997, 113 (3): 1000-1006
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9287995&dopt=Abstract
- 33 Fan X, Hamra FK, Freeman RH, Eber SL, Krause WJ, Lim RW, Pace VM, Currie MG, Forte LR: Uroguanylin: Cloning of preprouroguanylin cDNA, mRNA expression in the intestine and heart and isolation of uroguanylin and proguanylin from plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 219: 457-462
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8605009&dopt=Abstract
- 34 Fan X, Wang Y, London RM, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Forte LR: Signaling pathways for guanylin and uroguanylin in the digestive, renal, central nervous, reproductive, and lymphoid systems. *Endocrinology* 1997, 138 (11): 4636-4648
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9348189&dopt=Abstract
- 35 Hamra FK, Eber SL, Chin DT, Currie MG, Forte LR: Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94: 2705-2710
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9122260&dopt=Abstract
- 36 Kinoshita H, Nakazato M, Yamaguchi H, Matsukura S, Fujimoto S, Eto T: Increased plasma guanylin levels in patients with impaired renal functions. *Clinical Nephrology* 1997, 47 (1): 28-32
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9021238&dopt=Abstract
- 37 Greenberg RNM, Crytzer J, Krause WJ, Eber SL, Hamra FK, Forte LR: Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and Escherichia coli heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic peptide. *J. Investig. Med.* 1997, 45: 276-283
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9250001&dopt=Abstract
- 38 Fonteles MC, Greenberg RN, Monteiro HSA, Currie MG, Forte LR: Natriuretic and kaliuretic activity of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* 1998, 275: F191-F197
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9691007&dopt=Abstract
- 39 Kita T, Kitamura K, Sakata J, Eto T: Marked increase of guanylin secretion in response to salt loading in the rat small intestine. *Am J Physiol.* 1999, G960-966
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10564101&dopt=Abstract
- 40 London RM, Krause WJ, Fan X, Eber SL, Forte LR: Signal transduction pathways via guanylin and uroguanylin in stomach and intestine. *Am. J. Physiol.* 1997, 273: G93-105
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9252514&dopt=Abstract
- 41 Pfeifer A, Aszódi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fässler R: Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science* 1996, 274: 2082-2086
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8953039&dopt=Abstract

- 42 Ieda H, Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Hayakawa T: Effects of guanylin and uroguanylin on rat jejunal fluid and electrolyte transport: comparison with heat-stable enterotoxin. *Regul Pept* 1999, 79: 165-171
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10100931&dopt=Abstract
- 43 Snyder DJ, Merson MH: The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bull. WHO* 1982, 60: 605-613
of the global problem of acute diarrhoeal disease
- 44 Gianella RA: Pathogenesis of acute bacterial diarrheal disorders. *Annu. Rev. Med.* 1981, 32: 341-357
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7013673&dopt=Abstract
- 45 Van Noorden S: The neuroendocrine system in protostomian and deuterostomian invertebrates and lower vertebrates. In: Falkmer, S., Hakanson, R., Sundler, F. (eds.): *Evolution and tumor pathology of the Neuroendocrine System*. pp. 7-38. Elsevier Science, Amsterdam 1984
- 46 Reinecke, M.: Immunohistochemical localization of peptide hormones in endocrine cells of the digestive tract of *Brachistoma lanceolatum*. *Cell Tiss. Res.* 1981, 219: 445-456
- 47 Falkmer S, Van Noorden S: Ontogenie and phylogenie of the Glucagon cell. *Handbook Exp. Pharmacol.* 1983, 66: 81-119
- 48 Falkmer S: Comparative morphology of pancreatic islets in animals. In: Volk BW, Arquilla ER (eds.): *The Diabetic Pancreas*. pp. 17-50. Plenum, New York 1985
- 49 Falkmer S, El-Salhy M, Titlbach M: Evolution of the neuroendocrine system in vertebrates. A review with particular reference to the phylogenie and postnatal maturation of the islet parenchyma. In: Falkmer S, Hakanson R, Sundler F (eds.): *Evolution and Tumor Pathology of the Neuroendocrine System*. pp. 59-87. Elsevier Science, Amsterdam 1984
- 50 Junqueira LC, Carneiro J, Schiebler TH, Schneider F: *Histologie - Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 3. Auflage, 1991 Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest
- 51 Forssmann A: The ultrastructure of the cell types in the endocrine pancreas of the horse. *Cell Tissue Res.* 1976 Mar 16;167(2):179-95
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=769989&dopt=Abstract
- 52 Reinecke M, Falkmer S: *Gastrointestinale Hormone*. In: Hesch RD: *Endokrinologie*. Urban & Schwarzenberg. München - Wien - Baltimore, 1989
- 53 Thorner MO, Holl RW: *Physiologisches Wachstum*. In: Hesch RD: *Endokrinologie*. Urban & Schwarzenberg. München - Wien - Baltimore, 1989
- 54 Parker SL, Parker MS, Crowley WR: Characterization of rabbit kidney and brain pancreatic polypeptide-binding neuropeptide Y receptors: differences with Y1 and Y2 sites in sensitivity

- to amiloride derivatives affecting sodium transport. *Regul. Pept.* 1999, Jun 30;82(1-3):91-102.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10458651&dopt=Abstract
- 55 Parker SL, Parker MS: FMRFamides exert a unique modulation of rodent pancreatic polypeptide sensitive neuro peptide Y (NPY) receptors. *Can J Physiol Pharmacol.* 2000 Feb;78(2):150-61
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10737678&dopt=Abstract
- 56 Asakawa A, Inui A, Ueno N, Fujimiya M, Fujino MA, Kasuga M: Mouse pancreatic polypeptide modulates food intake, while not influencing anxiety in mice. *Peptides.* 1999 Dec;20(12):1445-1448
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10698120&dopt=Abstract
- 57 Ueno N, Inui A, Iwamoto M, Kaga T, Asakawa A, Okita M, Fujimiya M, Nakajima Y, Ohmoto Y, Ohnaka M, Nakaya Y, Miyazaki JI, Kasuga M: Decreased food intake and body weight in pancreatic polypeptide-overexpressing mice. *Gastroenterology.* 1999 Dec;117(6):1427-1432
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10579984&dopt=Abstract
- 58 Banting FG, Best CH: Pancreatic extracts. 1922. *J Lab Clin Med.* 1990 Feb;115(2):254-272
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2405086&dopt=Abstract
- 59 Zahn H, Brinkhoff O, Meienhofer J, Pfeiffer EF, Ditschuneit H, Gloxhuber C: Combining of synthetic insulin chains into biologically active preparations. *Z Naturforsch B* 1965 Jul;20(7):666-670
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=4379782&dopt=Abstract
- 60 Pohlmeier U, Otto H: Biological activity of fully synthetic insulin preparations. *Klin Wochenschr.* 1965 Aug 15;43(16):853-854
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=5862688&dopt=Abstract
- 61 Klostermeyer, H., R. E. Humbel: *Chemie und Biochemie des Insulins.* *Angew. Chemie* 78 (1966) 871
- 62 Steiner DF, Cho S, Bayliss C, Hallund O: On the isolation and some properties of bovine proinsulin. *Diabetes* 1968;17:309
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=5651730&dopt=Abstract
- 63 Krebs HA: Gluconeogenesis. *Proc. roy. Soc.* 159 (1964) 545
- 64 Kemmler W, Peterson JD, Rubenstein AH, Steiner DF: On the biosynthesis, intracellular transport and mechanism of conversion of proinsulin to insulin and C-peptide. *Diabetes* 1972;21(2):Suppl 2:572-581
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=4627852&dopt=Abstract
- 65 Kitabchi AE: Proinsulin and C-peptide. *Metabolism* 26 (1977) 547
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=403392&dopt=Abstract

- 66 Chan SJ, Keim P, Steiner DF: Cell free synthesis of rat preproinsulin: Characterization and partial amino acid sequence determination. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 73 (1976) 1964
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=778852&dopt=Abstract
- 67 Reaven GM: Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 37 (1988) 1595
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=3056758&dopt=Abstract
- 68 Ko AS, Smyth DG, Markussen J, Sunby F: The amino acid sequence of the C-peptide of human proinsulin. Eur. J. Biochem. 20 (1971) 190
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=5560404&dopt=Abstract
- 69 Orci L, Amherdt M, Malaisse-Lagae F, Rouiller C, Renold AE: Insulin release by emiocytosis: demonstration with freeze-etching technique. Science 1973 Jan 5;179(68): 82-84
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=4565325&dopt=Abstract
- 70 Lacy PE: The pancreatic beta cell. New Engl. J. Med. 276 (1967) 187
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=5333806&dopt=Abstract
- 71 Frerichs H, Reich U, Creutzfeldt W: Insulinsekretion *in vitro*. Klin. Wochenschr. 43 (1965) 136
- 72 Grodsky GM, Curry D, Landahl H, Pernet L: Further studies on the dynamic aspects of insulin release in vitro with evidence for a two-compartmental storage system. Acta diabet. lat. 1969; 6, Suppl. 1; 554
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=5371308&dopt=Abstract
- 73 Taguchi N, Aizawa T, Sato Y, Ishihara F, Hashizume K: Mechanism of glucose-induced biphasic insulin release: physiological role of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel-independent glucose action. Endocrinology 1995 Sep;136(9):3942-3948
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7649103&dopt=Abstract
- 74 Dean PM, Matthews EK: Electrical activity in pancreatic islet cells. Nature 1968; 219: 389-390
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=4873864&dopt=Abstract
- 75 Dean PM, Matthews EK: Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells. J Physiol 1970; 210: 255-264
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=5501260&dopt=Abstract
- 76 Matthews EK, Sakamoto Y: Electrical characteristics of pancreatic islet cells. J Physiol 1975; 246:421-437
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1095720&dopt=Abstract
- 77 Henquin JC, Meissner HP: Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic β -cells. Experimentia 1984; 40: 1043-1052
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=6386515&dopt=Abstract
- 78 Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ: Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers

- Arch 1981; 391: 85-100
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=6270629&dopt=Abstract
- 79 Cook DL, Hales CN: Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic β -cells. Nature 1984; 311: 271-273
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=6090930&dopt=Abstract
- 80 Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJH: Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. Nature 1984; 312: 446-448
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=6095103&dopt=Abstract
- 81 Kakei M, Kelly RP, Ashcroft SJ, Ashcroft FM: The ATP-sensitivity of K⁺ channels in rat pancreatic β -cells is modulated by ADP. FEBS Lett. 1986; 208:63-66
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2429869&dopt=Abstract
- 82 Dunne MJ, Peterson OH. Intracellular ADP activates K⁺ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. FEBS Lett 1986; 208: 59-62
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2429868&dopt=Abstract
- 83 Bokovist K, Eliasson L, Ämmälä C, Renstrom E, Rorsman P: Colocalization of L-type Ca⁺⁺ channels and insulin containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic β -cells. EMBO J 1995; 14: 50-57
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7828595&dopt=Abstract
- 84 Sturgess NC, Ashcroft ML, Cook DL, Hales CN: The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. Lancet 1985; 2: 474-475
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2412077&dopt=Abstract
- 85 Dunne MJ, Petersen OH: Potassium selective ion channels in insulin-secreting cells; physiology, pharmacology and their role in stimulus secretion coupling. Biochimica Biophysica Acta (Rev Biomembranes) 1991; 1071: 67-82
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1706203&dopt=Abstract
- 86 Wollheim CW, Sharp GWG: Regulation of insulin release by calcium. Phys Rev 1981; 61: 914-973
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=6117094&dopt=Abstract
- 87 Gilon P, Arredouani A, Gailly P, Gromada J, Henquin JC: Uptake and release of Ca⁺⁺ by the endoplasmatic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic Ca⁺⁺ concentration triggered by Ca⁺⁺ in the electrically excitable pancreatic β -cell. J Biol Chem 1999; 274: 20197-20205
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10400636&dopt=Abstract
- 88 Zhou YP, Teng D, Dralyuk F, Ostrega D, Roe MW, Philipson L, Polonsky KS: Apoptosis in insulin-secreting cells. Evidence for the role of intracellular Ca²⁺ stores and arachidonic acid metabolism. J Clin Invest. 1998, 101(8):1623-1632
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9541492&dopt=Abstract
- 89 Siegel EG, Wollheim CB, Sharp GWG, Herberg L, Ranold AE. Role of Ca⁺⁺ in impaired insulin release from islets of diabetic (C57BL/KsJ-db/db) mice. Am J Physiol 1980; 239:

E132-138

http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=6996492&dopt=Abstract

- 90 Kato S, Ishida H, Tsunra Y, Okamoto Y, Tsuji K, Horie M, Okada Y, Seino Y: Increased calcium-channel currents of pancreatic beta cells in neonatally streptozocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 1994; 43: 1395-1400
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7526124&dopt=Abstract
- 91 Roe MW, Worley JF 3rd, Tokuyama Y, Philipson LH, Sturis J, Tang J, Dukes ID, Bell GI, Polonsky KS: NIDDM is associated with loss of pancreatic β -cell L-type Ca^{++} channel activity. *Am J Physiol* 1996; 270: E133-140
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8772485&dopt=Abstract
- 92 Roe MW, Philipson LH, Frangakis CJ, Kuznetsov A, Mertz RJ, Lancaster ME, Spencer B, Worley JF 3rd, Dukes ID: Defective glucose-dependent endoplasmic reticulum Ca^{++} sequestration in diabetic mouse islet of Langerhans. *J Biol Chem* 1994; 269: 18279-18282
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8034570&dopt=Abstract
- 93 Kato S, Ishida H, Tsuura Y, Tsuji K, Nishimura M, Horie M et al.: Alterations in basal and glucose-stimulated voltage-dependent Ca^{++} channel activities in pancreatic β -cells of non-insulin-dependent diabetes mellitus GK rats. *J Clin Invest* 1996; 97: 2417-2425
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8647933&dopt=Abstract
- 94 Lindstrom P, Sehlin J, Frankel BJ: Glucose-stimulated elevation of cytoplasmic calcium is defective in the diabetic Chinese hamster islet β -cell. *Eur J Endocrinol* 1996; 134: 617-625
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8664983&dopt=Abstract
- 95 January CR, Ribar TJ, Means AR, Augustine GJ: Alterations in calcium channel currents underlie defective insulin secretion in a transgenic mouse. *J Biol Chem* 1996; 271: 15478-15485
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8663103&dopt=Abstract
- 96 Abdel-Halim SM, Guenifi A, Khan A, Larsson O, Berggren PO, Ostenson G et al.: Impaired coupling of glucose signal to the exocytotic machinery in diabetic GK rats: a defect ameliorated by cAMP. *Diabetes* 1996; 45: 934-940
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8666145&dopt=Abstract
- 97 Zaitsev S, Efanova I, Ostenson CG, Efendic S, Berggren PO: Delayed Ca^{++} response to glucose in diabetic GK rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 129-133
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9345282&dopt=Abstract
- 98 Hughes Faehling M, Thorneley CW, Proks P, Ahcroft FM, Smith PA: Electrophysiological and metabolic characterization of single β -cells and islets from diabetic GK rats. *Diabetes* 1998; 47: 73-81
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9421377&dopt=Abstract
- 99 Miki T, Tashiro F, Iwanaga T, Nagashima K, Yoshimoto H, Aihara H: Abnormalities of pancreatic islets by targeted expression of a dominant negative K_{ATP} channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 11969-11973
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9342346&dopt=Abstract

- 100 Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J, Seino S: Defective insulin secretion and enhanced insulin action in K_{ATP} deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10402-10406
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9724715&dopt=Abstract
- 101 Kindmark H, Kohler M, Arkhammer P, Efendic S, Larsson O, Lindne S et al.: Oscillations in cytoplasmic free calcium concentration in human pancreatic islets from subjects with normal and impaired glucose tolerance. *Diabetologia* 1994; 37: 1121-1131
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7867884&dopt=Abstract
- 102 Juntti-Berggren L, Larsson O, Rorsman P, Ammala C, Bokvist K, Wahlander K, Nicotera P, Dypbukt J, Orrenius S, Hallberg A.: Increased activity of L-type Ca^{++} channels exposed to serum from patients with type I diabetes. *Science* 1993; 261: 86-90
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7686306&dopt=Abstract
- 103 Cosgrove KE, Chapman JC, Shepherd RM, McIntyre S, Kjems L, Butler PC et al.: Ionic defects in the control of insulin release from human NIDDM β -cells in vitro. *Diabetologia* 1999; 42 (Suppl.1): A65
- 104 Levy J: Abnormal cell calcium homeostasis in type II diabetes mellitus: a new look on old disease. *Endocrine* 1999; 10: 1-6
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10403564&dopt=Abstract
- 105 Sjöholm A: Aspects of novel sites of regulation of the insulin stimulus secretion coupling in normal and diabetic pancreatic islets. *Endocrine* 1998; 9: 1-13
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9798725&dopt=Abstract
- 106 Kane C, Shepherd RM, Squires PE, Johnson PR, James RF, Milla PJ et al.: Loss of functional K_{ATP} channels in pancreatic β -cells causes persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy. *Nature Med* 1996; 2: 1344-1347
- 107 Dunne MJ, Kane C, Shephert RM, Sanches, JA, Jamerr RF, Johnson PR et al.: Familial persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy and mutations in the sulphonylurea receptor. *New Eng J Med* 1997; 336: 703-706
- 108 Lang J: Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* 1999; 259: 3-17
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9914469&dopt=Abstract
- 109 Aizawwa T, Komatsu M, Asanuma N, Sato Y, Sharp GWG: Glucose action "beyond ionic events" in the pancreatic β -cell. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 496-499
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9871411&dopt=Abstract
- 110 Komatsu M, Aitsawa T, Yokokawa N, Sato Y, takasu N, Yamada T: Masstoparan-induced hormone release from rat pancreatic islets. *Endocrinology* 1992; 30: 221-228
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1727698&dopt=Abstract
- 111 Gembal M, Gilon P, Henquin JC: Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K^{+} channels in mouse β -cells. *J Clin Invest*

- 1992; 89: 1288-1295
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1556189&dopt=Abstract
- 112 Best L, Yates AP, Tomlinson S: Stimulation of insulin secretion by glucose in the absence of diminished (86Rb+) permeability. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 2483-2485
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1610411&dopt=Abstract
- 113 Straub SG, James RFL, Dunne MJ, Sharp GWG: Glucose activates both K_{ATP} channel dependent and K_{ATP} channel independent signalling pathways in human islets. *Diabetes* 1998; 47: 758-764
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9588447&dopt=Abstract
- 114 Straub SG, James RFL, Dunne MJ, Sharp GWG: Glucose augmentation of mastoparan-stimulated insulin secretion in rat and human pancreatic islets. *Diabetes* 1998; 47: 1053-1057
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9648828&dopt=Abstract
- 115 Yajima H, Komatsu M, Schermerhorn T, Aizawa T, Koneko T, Nagai M et al.: cAMP enhances insulin secretion by an action on the ATP-sensitive K^+ channel independent pathway of glucose signalling in rat pancreatic islets. *Diabetes* 1999; 48: 1006-1012
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10331404&dopt=Abstract
- 116 Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230: 1350-1354
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2999980&dopt=Abstract
- 117 Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7276-7280
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1871133&dopt=Abstract
- 118 Zhao J, Araki N, Nishimoto SK: Quantitation of matrix Gla protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control. *Gene* 1995; 155: 159-165
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7721085&dopt=Abstract
- 119 Schägger H, v. Jagow G: Tricine-sodium-dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. *Anal. Biochem.* 1987; 166: 368-379
- 120 Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D: The multidrug resistance protein 5 (MRP5) Functions as an ATP-dependent Export Pump for Cyclic Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(39):30069-74
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10893247&dopt=Abstract
- 121 Gotoh M, Maki T, Kiyozumi T, Satomi S, Monaco AP: An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation* 1985 Oct;40(4):437-438
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=2996187&dopt=Abstract

- 122 Lacy PE, Kostianovsky M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967 Jan;16(1):35-39
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=5333500&dopt=Abstract
- 123 Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB: Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 1992 Jan;130(1):167-178
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1370150&dopt=Abstract
- 124 Sirotkin AV, Makarevich AV, Genieser H-G, Kotwica J, Hetenyi L: Effect of four cGMP Analogues with different Mechanisms of Action on Hormone Release by Porcine Ovarian Granulosa Cells in Vitro. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2000: 108, 214-219
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10926319&dopt=Abstract
- 125 Genieser H-G, Bucher B, Butt E: Rp-8-Br-PET-cGMPS, A New Potent Inhibitor of cyclic GMP-dependent Protein Kinase. *Proc. 9th Int. Conf. Second Mess. Phosphoprot.* 1995, Nashville, TN, USA: p.104, 212
- 126 Kunzelmann K, Kubitz R, Grolik M, Warth R, Greger R: Small-conductance Cl⁻ channels in HT29 cells: activation by Ca²⁺, hypotonic cell swelling and 8-Br-cGMP. *Pflugers Arch.* 1992 Jun;421(2-3):238-246
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1382268&dopt=Abstract
- 127 Rodriguez-Pascual F, Miras-Portugal MT, Torres M: Modulation of the dihydropyridine-insensitive Ca²⁺ influx by 8-bromo-guanosine-3':5'-monophosphate, cyclic (8-Br-cGMP) in bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci Lett.* 1994 Oct 24;180(2):269-272
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=7535409&dopt=Abstract
- 128 Sonnenburg WK, Beavo JA: Cyclic GMP and regulation of cyclic nucleotide hydrolysis. *Adv Pharmacol.* 1994;26:87-114
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8038108&dopt=Abstract
- 129 Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, DeJonge HR: Distinct and spezific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 1997: 22(8):307-12
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9270304&dopt=Abstract
- 130 Smolenski A, Burkhardt AM, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryan S, Lohmann SM, Walter U: Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998 Jul;358(1):134-139
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9721015&dopt=Abstract