

**Untersuchungen zur Bedeutung von GPR40 für die
Generation Fettsäure-induzierter Ca²⁺-Signale und
die Fettsäure-stimulierte Insulinsekretion in
pankreatischen β -Zellen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Oecotroph. Susanne Schnell

geboren am 07.12.1974 in Hannover

2007

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Korreferent: Prof. Dr. B. Otto

Tag der Promotion: 31. August 2007

FÜR MAMA, BIRTHE, MICHA, HELGA, ULLI UND DINA

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Zusammenfassung	11
2 Abstract	13
3 Einleitung	14
3.1 Die β-Zelle des Pankreas – Lage, Funktion	14
3.2 Insulin - Wirkung und Bedeutung	14
3.3 Diabetes mellitus – Definition, Diabetesformen, Komplikationen und weltweite Verbreitung	15
3.4 Ursachen und Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus	17
3.5 Physiologische Insulinsekretion durch die pankreatische β-Zelle	19
3.5.1. Glukose-induzierte Insulinsekretion	20
3.5.2 Exkurs: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	22
3.5.2.1 Struktur und Aktivierung	22
3.5.2.2 G-Protein-Subfamilien	23
3.5.2.3 Funktionelle Charakteristika von GPCRs	23
3.5.2.4 Liganden, Funktionen, „Orphan-GPCRs“	23
3.5.2.5 Bedeutung mutierter und Wildtyp-GPCRs für Medizin und Pharmakologie	24
3.5.3 Hormon- und Neurotransmitter-induzierte Insulinsekretion	25
3.5.3.1 PLC-gekoppelte Agonisten und Insulinsekretion	25
3.5.3.2 Adenylatcyclase-gekoppelte Agonisten und Insulinsekretion	26
3.5.4 Fettsäuren und Insulinsekretion	27
3.5.4.1 Wirkungen von Fettsäuren auf die Insulinsekretion	27
3.5.4.2 Insulinotrope Effekte akut erhöhter Fettsäurespiegel - Wirkmechanismen	27
3.6 Deorphanisierung von GPR40	30
3.7 Ziele der Untersuchungen	31
4 Material und Methoden	33
4.1 Material	33
4.1.1 Geräte	33
4.1.2 Chemikalien	34
4.1.3 Verbrauchsmaterial	36
4.1.4 Verwendete Reagenziensätze	36
4.1.5 Verwendete Enzyme	37
4.1.6 Verwendete Zellen	37
4.1.6.1 Primäre β -Zellen der Maus	37
4.1.6.2 Zelllinien	37

4.1.7	Verwendete Primer und TaqMan-Probes	38
4.1.8	Verwendete siRNAs	39
4.1.9	Verwendete Plasmide.....	40
4.1.10	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	40
4.1.11	Stammlösungen.....	41
4.2	Methoden.....	41
4.2.1	Präparation von primären β -Zellen der Maus	41
4.2.1.1	Präparation von Langerhans-Inseln.....	41
4.2.1.2	Gewinnung einzelner Inselzellen	42
4.2.2	Allgemeine Zellkulturverfahren	43
4.2.2.1	Kultivierung der Zellen.....	43
4.2.2.2	Passagieren von Zellen	43
4.2.2.3	Einfrieren von Zellen.....	44
4.2.2.4	Auftauen von Zellen.....	44
4.2.3	Spezifische Reduktion der Expression von GPR40.....	45
4.2.3.1	Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi).....	45
4.2.3.2	Methode zur Transfektion von siRNA in Säugerzellen: Lipofektion ...	45
4.2.3.2.1	Etablierung des Protokolls für die Transfektion von siRNA in INS-1 Zellen.....	46
4.2.3.2.2	Etabliertes Protokoll für die Transfektion von siRNA in INS-1 Zellen.	46
4.2.4	Heterologe Expression von humanem GPR40 (hGPR40) in HEK-293 Zellen.....	47
4.2.4.1	Etablierung des Protokolls für die Transfektion von hGPR40-Rezeptor in HEK-293 Zellen	47
4.2.4.2	Bestimmung der Transfektionseffizienz.....	47
4.2.4.3	Etabliertes Protokoll für die Transfektion von hGPR40-Rezeptor in HEK-293 Zellen	48
4.2.5	Herstellung der Fettsäure-Stimulationslösungen	48
4.2.6	Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in Einzelzellen	49
4.2.6.1	Prinzip der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2.....	49
4.2.6.2	Vorbereitung der Zellen für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit Fura-2	50
4.2.6.3	Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit dem Photomultiplier.....	51
4.2.6.4	Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit digitalem Video-Imaging	52
4.2.7	Stimulation und Messung der Insulinsekretion	53
4.2.7.1	Stimulation der Insulinsekretion.....	53
4.2.7.2	Messung der Insulinsekretion	54
4.2.8	Quantitative Genexpressionsanalyse	55
4.2.8.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen	55
4.2.8.2	DNase-Verdau der isolierten Gesamt-RNA	55
4.2.8.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	56
4.2.8.4	Qualitätskontrolle einer RNA-Präparation.....	56
4.2.8.5	Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)	58
4.2.8.6	Quantitative Real-Time-PCR	59
4.2.8.7	Berechnung der Genexpression	60
4.2.9	Agarose-Gelelektrophorese.....	61
4.2.10	Mutagenese.....	62

4.2.10.1	Design der Mutageneseprimer	63
4.2.10.2	Durchführung der Mutagenese-PCR	63
4.2.11	Transformation der mutierten PCR-Plasmide in <i>E. coli</i>	64
4.2.12	Picken der Kolonien und Ansetzen der Übernachtskulturen.....	65
4.2.13	Präparation von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen.....	65
4.2.14	DNA-Sequenzierung nach Sanger	66
4.2.15	Computergestützte Sequenzanalysen	68
4.2.16	Statistische Auswertung	69
5	Ergebnisse	70
5.1	Untersuchung des Einflusses von Fettsäuren auf die $[Ca^{2+}]_i$ und die Insulinsekretion muriner β-Zellen bei vollständiger und herabregulierter GPR40-Expression.....	70
5.1.1.1	Einfluss verschiedener Fettsäuren auf die $[Ca^{2+}]_i$ primärer β -Zellen der Maus.....	70
5.1.1.2	Einfluss verschiedener Fettsäuren auf die $[Ca^{2+}]_i$ in INS-1 Zellen	72
5.1.1.3	Mechanismen des Fettsäuren-induzierten Ca^{2+} -Signals in INS-1 Zellen	75
5.1.1.4	Einfluss verschiedener Fettsäuren auf die Insulinsekretion in INS-1 Zellen.....	77
5.1.2	Untersuchung des Einflusses von Fettsäuren auf die $[Ca^{2+}]_i$ und die Insulinsekretion bei herabregulierter GPR40-Expression	78
5.1.2.1	Ergebnisse der Vorversuche	78
5.1.2.1.1	Nachweis der nativen Expression von GPR40 in INS-1 Zellen.....	78
5.1.2.1.2	Qualitätskontrolle der isolierten RNA.....	79
5.1.2.1.3	Etablierung eines Protokolls für die Transfektion von INS-1 Zellen mit siRNA zur spezifischen Herabregulation der GPR40-Expression.....	79
5.1.2.2	Einfluss der GPR40-Herabregulation auf das Fettsäure-induzierte Ca^{2+} -Signal	82
5.1.2.3	Einfluss der GPR40-Herabregulation auf die FS-induzierte Insulinsekretion.....	86
5.2	<i>In vitro</i>-Untersuchung der funktionellen Relevanz natürlich vorkommender Mutationen des humanen heterolog in HEK-293 Zellen exprimierten GPR40	89
5.2.1	Ergebnisse der Vorversuche	89
5.2.1.1	Etablierung eines Transfektionsprotokolls für die heterologe Expression von hGPR40 in HEK-293 Zellen	89
5.2.1.2	Herstellung der GPR40-Mutationen mittels zielgerichteter Mutagenese	92
5.2.2	Funktionelle Charakterisierung der GPR40-Mutationen - Einfluss der Mutationen auf die FS-induzierten Ca^{2+} -Signale	94
6	Diskussion	97
6.1	Auswahl eines geeigneten Modellsystems	97
6.1.1	Primäre β -Zellen	97
6.1.2	Die INS-1-Zelllinie als Modellsystem	98

6.2	Einfluss von Fettsäuren auf die $[Ca^{2+}]_i$ und die Insulinsekretion muriner β-Zellen bei vollständiger und herabregulierter GPR40-Expression	99
6.3	Funktionelle Relevanz natürlich vorkommender Mutationen des humanen heterolog in HEK-293 Zellen exprimierten GPR40	104
6.4	Aktueller Stand der GPR40-Forschung in der pankreatischen β-Zelle und Ausblick.....	106
	Literaturverzeichnis	110
	Anhang	131

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung einiger Hauptmechanismen der Insulinsekretion in der pankreatischen β -Zelle	21
Abb. 2: Schema der von Remizov et al. 2003 zusammengefassten Hypothesen der Wirkmechanismen, über die akut erhöhte Spiegel freier Fettsäuren (FFS) zur Stimulation der Insulinfreisetzung beitragen.....	29
Abb. 3: Effekte von FFS auf die $[Ca^{2+}]_i$ in primären β -Zellen der Maus	71
Abb. 4: FFS-induzierte Ca^{2+} -Signale in INS-1 Zellen	74
Abb. 5: Mechanismen des Ölsäure-induzierten Ca^{2+} -Signals in INS-1 Zellen	76
Abb. 6: FFS-induzierte Insulinsekretion aus INS-1 Zellen	77
Abb. 7: GPR40 Expressions-Analyse in INS-1 Zellen	78
Abb. 8: Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA durch Ethidiumbromidfärbung	79
Abb. 9: GPR40-Expressionsanalyse in INS-1 Zellen nach Transfektion der Zellen mit NC siRNA bzw. GPR40 spezifischer siRNA	81
Abb. 10: Einfluss der siRNA-Behandlung auf die Ölsäure- und AVP-induzierten Ca^{2+} -Signale in INS-1 Zellen	84
Abb. 11: Einfluss der siRNA-Transfektion auf das FFS-induzierte Ca^{2+} -Signal in INS-1 Zellen	85
Abb. 12: Einfluss der siRNA-Behandlung auf die FS-induzierte Insulinsekretion aus INS-1 Zellen	87
Abb. 13: Mikroskopische Darstellung von mit GFP transfizierten HEK-293 Zellen	91
Abb. 14: Sequenzanalyse der GPR40-Mutanten.....	93
Abb. 15: Ölsäure-induzierte Ca^{2+} -Signale erzeugt am humanen heterolog in HEK-293 Zellen exprimierten GPR40-Wildtyp-Rezeptor	95
Abb. 16: Dosis-Wirkungskurven für Ölsäure am Wildtyp GPR40-Rezeptor und seine beiden mutierten Formen Asp175Asn und Arg211His, gemessen an der induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$	96
Abb. 17: Codon-Sonne	136

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Für TaqMan-PCR-, Mutagenese- und Sequenzierungsreaktionen eingesetzte Primer und Probes	39
Tab. 2: Verwendete siRNAs	40
Tab. 3: Verwendete Plasmide	40
Tab. 4: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	40
Tab. 5: Wirksamkeit verschiedener FFS bezüglich eines Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in β -Zellen	72
Tab. 6: Einfluss der Transfektionsbedingungen bei der Transfektion von siRNA in INS-1 Zellen auf die GPR40 mRNA-Expression der Zellen.....	80
Tab. 7: Für die Etablierung eines Transfektionsprotokolls von Plasmid-DNA in HEK-293 Zellen eingesetzte, variable Parameter und deren Einfluss auf die Transfektionseffizienz in HEK-293 Zellen.....	90

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AC	Adenylatcyclase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AM	Acetomethylester
Amp	Ampicillin
Arg	Arginin (R)
Asn	Asparagin (N)
Asp	Asparaginsäure (D)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool, Programm zur Analyse von Sequenzdaten
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalzium
[Ca ²⁺] _i	freie intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
Δ[Ca ²⁺] _i	Maximaler Anstieg der [Ca ²⁺] _i
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-monophosphat
cDNA	copy-DNA (komplementäre DNA)
CHO	chinese hamster ovary cells
CPT-I	Carnitin-Palmitoyltransferase-I
DAG	Diacylglycerin
dATP	Desoxyadensosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

DNase	Desoxyribonuklease
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EC ₅₀	halb-maximale effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis (β-Aminoethyläther)-N, N, N', N'-Tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
FA-	Formaldehyd-Agarose-
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FFS	freie Fettsäuren
FS	Fettsäure
Fura-2/AM	Fura-2/Acetoxymethylester
fw	forward (vorwärts)
g	Gramm
g	gravity (Erdbeschleunigung)
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyd 3-phosphatdehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GIP	glucose dependent insulinotropic factor
GLP-1	glucagon-like peptide 1
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPCR	G-protein-coupled receptor (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GPR40	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 40

GPR40 siRNA	gegen Ratten-GPR40 spezifische siRNA
GSIS	glucose stimulated insulin secretion
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK-293	human embryonic kidney cells
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
hGPR40	Human-GPR40
His	Histidin (H)
INS-1	insulin-secreting cell line 1
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kb	Kilobasen
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Broth
m	milli-
μ	mikro
M	molar
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MEM	minimum essential medium
MeOH	Methanol
Min.	Minute(n)
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
n	Stichprobenumfang
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NC siRNA	negative control (Negativkontroll) siRNA
nM	nanomolar
n.s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
Oligo-dT	Oligodeoxythymidin
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pfu	plaque-forming units (plaquebildende Einheiten)
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PP-Zellen	Pankreatisches Polypeptid-sezernierende Zellen
RBP4	Retinol-bindendes Protein 4
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-interference (RNA-Interferenz)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
rv	reverse (rückwärts)
s	Sekunde
S.E.M.	Standardfehler des arithmetischen Mittelwerts
SNP	single nucleotide polymorphism
siRNA	small interfering RNA
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Uracil
U	unit (Einheit)
UV	Ultraviolet
V	Volt
VDCC	voltage-dependent calcium channels (spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle)
vs.	versus (im Vergleich zu)

v/v	Volumen pro Volumen
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
wt	Wildtyp

1 Zusammenfassung

Typ-2-Diabetes macht weltweit ca. 90% aller zuckerkranken Patienten aus und die Zahl der Erkrankungen nimmt ständig zu. Bei diesem heterogenen Krankheitsbild führen genetische Defekte der Insulinwirkung und der Insulinsekretion in Verbindung mit erworbenen Faktoren zu einer durch chronische Hyperglykämie charakterisierten Regulationsstörung des Stoffwechsels.

Die Insulinsekretion aus pankreatischen β -Zellen ist ein multifaktorieller und komplexer Prozess. Neben verschiedenen anderen Faktoren steuern freie Fettsäuren (FFS) die Insulinsekretion. Obwohl bekannt ist, dass akut erhöhte Fettsäurespiegel einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) hervorrufen und die Insulinsekretion stimulieren, existierten bezüglich der dahinter stehenden Wirkmechanismen lange Zeit lediglich Hypothesen. Diese gingen davon aus, dass die durch FFS hervorgerufenen Wirkungen deren Aufnahme in die β -Zelle erfordern. In der Literatur fanden sich diesbezüglich jedoch widersprüchliche Untersuchungsergebnisse, die zum Teil diese Hypothesen in Frage stellten und nach einem alternativen Wirkmechanismus verlangten. Die kürzlich erfolgte Deorphanisierung des G-Proteingekoppelten Rezeptors GPR40, der reichlich im Pankreas und in insulinsezernierenden β -Zellen exprimiert ist und durch mittel- und langkettige Fettsäuren (FS) aktiviert wird, lieferte hier einen neuen Ansatzpunkt.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Bedeutung von GPR40 für die Generation FS-induzierter Ca^{2+} -Signale und die FS-stimulierte Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen in zwei murinen *in vitro*-Modellen untersucht.

In primären β -Zellen der Maus und in der Ratteninsulinomzelllinie INS-1 rief ein großes Spektrum an gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigten mittel- und langkettigen FS in Gegenwart einer substimulatorischen Glukosekonzentration einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ hervor, während die kurzkettige FS Capronsäure keinen Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ dieser Zellen zeigte. Dieses Profil der Wirkung entsprach dem der Erstbeschreibung von heterolog in Reporterzellen exprimiertem GPR40-Rezeptor. Das FS-induzierte Ca^{2+} -Signal in INS-1 Zellen erforderte die Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und einen Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ. Dieses Signalmuster ist typisch für Agonisten, die G_{α_q} -gekoppelte Rezeptoren aktivieren. Die Stimulation von INS-1 Zellen mit ausgewählten GPR40-Agonisten führte zur Stimulation der Insulinsekretion.

Die native GPR40-Expression in INS-1 Zellen konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Eine Hemmung der GPR40-Expression in INS-1 Zellen über RNA-Interferenz führte zu einer signifikanten Reduktion der FS-induzierten Ca^{2+} -Signale und der FS-induzierten Insulinsekretion, die darauf hinweisen, dass der Großteil der stimulatorischen Effekte von FFS auf die Insulinsekretion über eine Aktivierung von GPR40 vermittelt wird.

Aufgrund der Beschreibung zweier natürlich vorkommender Mutationen des GPR40-Rezeptors beim Menschen in der Literatur, wurde im zweiten Teil der Arbeit am *in vitro*-Modell untersucht, ob diese Mutationen zu einer Funktionsveränderung des GPR40-Rezeptors führen und damit möglicherweise als genetische Grundlage im Zusammenhang mit der Entstehung des Typ-2-Diabetes stehen.

Die Mutationen wurden mittels zielgerichteter Mutagenese in die cDNA des humanen Wildtyp(wt)-GPR40-Rezeptors eingefügt. Anschließend wurden der wt-Rezeptor und seine mutierten Formen transient in HEK-293 Zellen exprimiert, mit verschiedenen FS-Konzentrationen stimuliert und deren Wirkung auf die $[Ca^{2+}]_i$ gemessen. Der Vergleich der entstandenen Dosis-Wirkungskurven ergab, dass keine der beiden GPR40-Mutanten sich funktionell vom wt-Rezeptor unterschied, so dass ihnen im Bezug auf die Typ-2-Diabetes Pathogenese wahrscheinlich keine Bedeutung zukommt.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen liefern -zusammen mit denen anderer Arbeitsgruppen- einen neuen Aspekt im komplexen intermolekularen Netzwerk der Insulinsekretions-Kaskade der β -Zelle und einen Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Medikamente für die Behandlung des Typ-2-Diabetes.

Schlagworte: GPR40, freie Fettsäuren, Insulinsekretion

2 Abstract

Type 2 diabetes, which accounts for approximately 90% of all diabetes, is a serious worldwide health issue with a continuously increasing incidence. In this disease a genetic defect of insulin secretion and/or insulin resistance driven by environmental factors results in an improper regulation of the metabolism characterized by chronic hyperglycaemia.

A complex network of signalling pathways is involved in the mechanism of insulin secretion from pancreatic β -cells with various factors modifying its secretion, amongst which are free fatty acids (FFA). A short-term increase in free fatty acids (FFA) is known to cause a rise in cytosolic free Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and to stimulate insulin release from pancreatic β -cells. The underlying mechanisms by which FFA exert these effects have long been hypothesized and thought to involve the metabolism of the FFA within the β cell. Contradictory findings in the literature however questioned the existing hypotheses and favoured an alternate view. The recent deorphanization of the G-protein-coupled receptor GPR40, which is abundantly expressed in the pancreas of rat and human as well as in pancreatic β -cell lines, can be activated by various medium- and long-chain FFA.

The aim of the present study was therefore to investigate whether GPR40 is involved in the generation of the FFA-induced Ca^{2+} signal and insulin secretion from pancreatic β -cells (primary mouse β -cells and INS-1 cells).

A wide range of saturated, mono- and polyunsaturated medium- and long-chain FFA caused a rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ both in primary mouse β -cells and in INS-1 cells in the presence of 5 mM glucose. By contrast the short-chain caproic acid was ineffective in increasing $[\text{Ca}^{2+}]_i$. This is consistent with the reported agonist profile of the GPR40 receptor expressed in heterologous cell systems. In INS-1 cells the FFA-induced Ca^{2+} signal required mobilization of internal Ca^{2+} and Ca^{2+} influx through voltage-sensitive Ca^{2+} channels. This resembles the properties of Ca^{2+} signals elicited by agonists known to activate receptors coupled via $\text{G}\alpha_q$ to the phospholipase C (PLC)-signalling pathway. Stimulation of INS-1 cells with selected GPR40-agonists also stimulated insulin secretion.

RT-PCR analysis revealed that GPR40 is expressed in INS-1 cells. Downregulation of GPR40 by specific siRNA treatment lead to a significant inhibition of the FFA-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response and was nearly paralleled by the inhibition of insulin secretion, because downregulation of GPR40 expression largely and significantly abolished the FFA-induced stimulation of insulin secretion from INS-1 cells. The results suggest that the action of FFA is predominantly mediated through GPR40.

Two naturally occurring nucleotide substitutions of the GPR40 receptor in humans have been identified. Therefore the second aim was to examine whether the identified variants lead to an impaired function of the receptor and might therefore play a role in the pathogenesis of Type 2 diabetes by affecting insulin secretion.

The two GPR40 mutations were inserted into the cDNA of the human wildtype(wt)-GPR40 receptor by site-directed mutagenesis. The wt-GPR40 and its two variants were then transiently transfected into HEK-293 cells and the potential impact of GPR40 mutations on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was estimated after stimulation with various concentrations of FFA. Since no functional difference between wt-GPR40 and its two variants could be observed, the identified variants do not appear to be involved in the pathogenesis of Type 2 diabetes.

The results of this *in vitro*-study along with the results of other groups provide a novel potential drug target for the development of novel antidiabetic drugs, which might help to fight Type 2 diabetes more efficiently in the future.

Keywords: GPR40; free fatty acids; insulin secretion

3 Einleitung

3.1 Die β -Zelle des Pankreas – Lage, Funktion

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) besteht zu 99% aus exokrinem Gewebe, in dem das Verdauungssekret gebildet wird, und zu 1% aus endokrinen Anteilen, den sog. Langerhans-Inseln (Hedeskov 1980). Das sind Zellgruppen, die wie Inseln unregelmäßig in das exokrine Pankreasgewebe eingebettet sind. Das menschliche Pankreas enthält ungefähr 1 – 2 Millionen Inseln mit jeweils etwa 1000 Zellen, wobei vier verschiedene Zelltypen unterschieden werden können, die die Hormone produzieren (Junqueira und Carneiro 1996, Hellman et al. 1964): Die Insulin-produzierenden β -Zellen bilden mit ungefähr 70% den Hauptanteil der Inselzellen und sind hauptsächlich im Inneren der Insel lokalisiert. Vorwiegend in der Inselperipherie befinden sich die Glukagon-produzierenden α -Zellen, die etwa 20% der Inselzellen ausmachen. Die übrigen 10% der Inselzellen sind die Somatostatin-produzierenden δ -Zellen und die pankreatisches Polypeptid-produzierenden PP-Zellen (Junqueira und Carneiro 1996).

Die β -Zellen sind die einzigen Zellen im Organismus, die in der Lage sind, Insulin zu bilden und es beim Gesunden angepasst an den jeweils akuten Bedarf auf sehr präzise Art und Weise freisetzen. Insulin ist ein kleines globuläres Proteinhormon (Molekulargewicht 5800 d), das bis zu seiner Freisetzung in Vesikeln, den sog. sekretorischen Granula, im Zytosol der β -Zelle gespeichert wird (Kahn et al. 2006, Docherty und Steiner 1997). Die Regulation der Biosynthese und der Sekretion des Insulins erfolgen primär in Abhängigkeit von der Blutzuckerkonzentration. Somit stellt ein Glukosereiz den wichtigsten physiologischen Stimulus für die insgesamt durch vielfältige Effektoren komplex koordinierte und unter 3.5 beschriebene Insulinsekretion durch die β -Zelle des Pankreas dar (Rösen 1999).

3.2 Insulin - Wirkung und Bedeutung

Insulin ist ein anaboles Stoffwechselformon und stellt zusammen mit seinem Gegenspieler Glukagon einen der wichtigsten Regulatoren des Energiestoffwechsels dar (Stryer 1999). Insulin steuert sowohl in der Resorptions-

wie in der Postresorptionsphase den Austausch und die Verteilung von Substraten und hat ein breites und komplexes Wirkungsspektrum (Rösen 1999). Im Wesentlichen signalisiert Insulin den Sättigungszustand und stimuliert auf verschiedenen Wegen die Brennstoffspeicherung. In der Leber und im Muskel fördert es die Glykogensynthese und unterdrückt die Glukoneogenese in der Leber. Ferner wird in der Leber die Glykolyse gefördert, was wiederum die Fettsynthese steigert. Des Weiteren wird der Eintritt von Glukose in Muskel- und Fettzellen durch Insulin gefördert, wobei ein Überschuss an Fettsäuren und Glukose im Fettgewebe auch zu Synthese und Speicherung von Triacylglyceriden führt. Ebenso fördert Insulin die Aufnahme verzweigtkettiger Aminosäuren wie Valin, Leucin und Isoleucin in den Muskel, was dort den Proteinaufbau begünstigt. Es wirkt aber auch generell anregend auf die Proteinbiosynthese und hemmend auf den Proteinabbau (Stryer 1999). Wie die komplexen Insulinwirkungen zeigen, ist Insulin, als einziges Hormon, das den Blutzuckerspiegel senken kann, durch die Vermittlung o.g. Effekte maßgeblich an der Blutzuckerregulation beteiligt, zusätzlich aber auch am gesamten Brennstoffmetabolismus.

Ungefähr 10% der Bevölkerung leiden an Störungen des Insulinsystems, wobei die häufigste Erkrankung der Diabetes mellitus ist, dem eine gestörte Ausschüttung von Insulin und/oder eine verminderte Insulinwirkung zugrunde liegt. Zu hohe Insulinkonzentrationen, wie sie z.B. beim Hyperinsulinismus vorkommen, senken den Blutzuckerspiegel dramatisch ab und können zu Zittern, Schweißausbruch, Apathie, Krampfanfällen bis hin zum hypoglykämischen Schock mit Todesfolge führen (Meissner et al. 1999, Junqueira und Carneiro 1996).

3.3 Diabetes mellitus – Definition, Diabetesformen, Komplikationen und weltweite Verbreitung

Diabetes mellitus umfasst eine durch chronische Hyperglykämie charakterisierte Regulationsstörung des Stoffwechsels mit multipler Ätiologie, der ein Defekt der Sekretion und/oder der Wirkung des Insulins zugrunde liegt (Kerner et al. 2004, Alberti und Zimmet 1998). Nach Definition der American Diabetes Association

(ADA) liegt ein Diabetes mellitus vor, wenn der Wert der Nüchternplasmaglukose ≥ 7 mmol/l bzw. ≥ 126 mg/dl beträgt (ADA 1997).

Die beiden wichtigsten Formen, sind der Typ-1-Diabetes, von dem 5-10% aller an Diabetes erkrankten Menschen betroffen sind und der Typ-2-Diabetes, dem ungefähr 85-90% der Menschen mit Diabetes zuzuordnen sind (Hauner 2006, Spinass und Lehmann 2006). Die weiteren Diabetes-Typen, zu denen die spezifischen Diabetestypen (z.B. MODY, „Maturity Onset Diabetes of the Young“ und MIDD, „Maternally inherited Diabetes and Deafness“) sowie der Gestationsdiabetes zählen, kommen selten vor (Spinass und Lehmann 2006, Kerner et al. 2004).

Der Typ-1-Diabetes entsteht durch eine autoimmun bedingte Zerstörung der β -Zellen in den Pankreasinseln, in deren Folge es zu einem absoluten Insulinmangel kommt. Die Manifestation des Insulinmangelsyndroms geht in der Regel mit den klassischen Symptomen der Polyurie, Polydipsie und Gewichtsverlust einher. Im Akutfall kann es zu einer schweren ketoazidotischen Stoffwechsellage mit Bewusstseinsverlust kommen (Kerner et al. 2004). Die diabetischen Folgeschäden entsprechen denen des Typ-2-Diabetes. Die Krankheit ist derzeit noch nicht heilbar, lässt sich jedoch durch Insulinsubstitution behandeln (Übersicht über die Pathogenese bei Spinass 2000).

Der Typ-2-Diabetes ist ein komplexes Krankheitsbild, bei dem genetische Defekte der Insulinwirkung und der Insulinsekretion in Verbindung mit erworbenen Faktoren zu der metabolischen Störung führen (Spinass und Lehmann 2001).

Bei einem Typ-2-Diabetes kommt es selten zu schweren akuten Stoffwechsellagen, jedoch treten, in Abhängigkeit von der Blutzuckereinstellung, Begleiterkrankungen und diabetische Folgeschäden auf, die die wesentlichen Risiken dieser Erkrankung darstellen. Bei vielen Betroffenen ist durch Schäden an der Niere (Nephropathie), am Nervensystem (Neuropathie), an den Augen (Retinopathie), sog. „mikrovaskuläre Komplikationen“ (Mikroangiopathie), und an den großen Blutgefäßen des Herzens, den hirnersorgenden Arterien und den Arterien der Beine, sog. „makrovaskuläre Schäden“ (Makroangiopathie), die Lebensqualität vermindert und die

Lebenserwartung deutlich reduziert (Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993, UK Prospective Diabetes Study GROUP 1998, Robert Koch-Institut 2005).

Diabeteserkrankungen treten weltweit immer häufiger auf (Hauner 2006). Der Zuwachs betrifft im Wesentlichen Erkrankte mit Typ-2-Diabetes. Verantwortlich sind dafür vor allem die dramatische Zunahme des Übergewichts als der wichtigste Risikofaktor sowie die zunehmende Überalterung der Gesellschaft (Liebermeister 2006, Kasuga 2006).

Aktuellen Schätzungen zufolge sind gegenwärtig zwischen 151-171 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt. Diese Zahl wird sich bis zum Jahr 2030 mehr als verdoppeln, was den Diabetes zu einer der häufigsten und teuersten Erkrankungen weltweit machen wird (Kasuga 2006, Zimmet et al. 2001, Pfeiffer 2000).

3.4 Ursachen und Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus

Eine wesentliche Bedeutung bei der Entstehung des Typ-2-Diabetes kommt genetischen Faktoren zu. Dies wurde bei Untersuchungen an eineiigen Zwillingen beobachtet: Bei ca. 90% der an Typ-2-Diabetes erkrankten Zwillinge waren jeweils beide Zwillingsgeschwister betroffen. Daraus lässt sich schließen, dass Zwillinge wegen ihrer identischen genetischen Prädisposition beinahe das gleiche Risiko haben, an Typ-2-Diabetes zu erkranken. Die zugrunde liegenden genetischen Faktoren sind allerdings bisher noch nicht vollständig bekannt (Newman et al. 1987, Barnett et al. 1981). Es wird davon ausgegangen, dass sich der Typ-2-Diabetes als Folge mehrerer zusammentreffender Gendefekte entwickelt, wobei die krankheitsdisponierenden Gendefekte selbst von Person zu Person verschieden sein können (Kasuga 2006, Palitzsch und Bollheimer 2000).

Als ausschlaggebende Realisationsfaktoren der Erkrankung wirken neben der genetischen Disposition äußere Umstände wie Übergewicht (in 60-90% der Fälle), insbesondere abdominelle Adipositas, falsche Ernährung und mangelnde körperliche Aktivität mit. (Anderson et al. 2003, Spinass und Lehmann 2001, Carey et al. 1997). Überwiegend tritt Typ-2-Diabetes erst im höheren Lebensalter auf,

obwohl international auch zunehmend Fälle betroffener Kinder und Jugendlicher beschrieben werden (Alberti 2004, Kapellen et al. 2004).

Ein zentraler Faktor in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes ist eine periphere Insulinresistenz (Lillioja et al. 1993, Martin et al. 1992, Banerji et al. 1989). Sie liegt dann vor, wenn eine normale Insulinkonzentration zu einer subnormalen biologischen Antwort in den Zielgeweben führt. Die Folgen in Bezug auf den Kohlenhydratstoffwechsel sind neben einer verminderten Glukoseaufnahme im Muskel- und Fettgewebe auch eine gesteigerte endogene Glukoseproduktion in der Leber. In Protein- und Fettstoffwechsel bewirkt die Insulinresistenz eine verringerte intrazelluläre Aufnahme von Aminosäuren und einen gesteigerten Fettabbau mit Erhöhung der zirkulierenden freien Fettsäuren (Palitzsch und Bollheimer 2000, DeFronzo 1997).

Im gleichen Maße wie die periphere Insulinresistenz liegt beim Typ-2-Diabetes wahrscheinlich ein genetisch vererbter intrinsischer β -Zelldefekt in Form von Störungen der Insulinsekretion und -produktion vor, so dass eine dauerhafte Insulin(mehr)sekretion zur Kompensation der Insulinresistenz nicht aufrecht erhalten werden kann und es zu einem stufenweise fortschreitenden Versagen der β -Zellfunktion kommt (Prentki und Nolan 2006, Kahn 1998, Polonsky 1996).

Trotz aufwendiger Suche nach Kandidaten-Genen im komplexen Netzwerk der Insulinsekretions-Kaskade der β -Zelle konnten bislang erst wenige, wahrscheinlich für die β -Zelldysfunktion verantwortliche molekulare Defekte identifiziert werden wie z.B. Defekte am K_{ATP} -Kanal oder der PKC (Grant et al. 2006, Spinas und Lehmann 2001).

Neben den genetischen Defekten der Insulinwirkung und der Insulinsekretion sind im Zusammenhang mit Typ-2-Diabetes auch erworbene Defekte der Insulinsekretion von Bedeutung. Eine langandauernde Hyperglykämie, die durch eine falsche Ernährungsweise noch gefördert werden kann, führt zunächst zu einer „Desensitisierung“ und später zur Apoptose der β -Zelle. Dieses Phänomen wird als Glukotoxizität bezeichnet (Spinas und Lehmann 2001).

Einerseits werden beim insulinresistenten, an Typ-2-Diabetes Erkrankten infolge des gestörten Fettstoffwechsels, andererseits aber auch aufgrund der in den meisten Fällen vorliegenden Adipositas, insbesondere abdominelle Adipositas, vermehrt freie Fettsäuren ins Blut abgegeben. Dadurch sind die β -Zellen hohen Konzentrationen an Fettsäuren ausgesetzt. Dies führt nach anfänglich vermehrter Insulinsekretion (Hyperinsulinämie) zu einer sukzessiven Abnahme der Insulinspeicher-Reserve und damit zur Abnahme der Insulinsekretion aus den β -Zellen. Außerdem verstärken die hohen Konzentrationen an Fettsäuren die Insulinresistenz, da sie in der Muskulatur akkumulieren, wo sie die Glukoseutilisation beeinträchtigen (Randle 1998). Zudem führt das erhöhte Angebot von Fettsäurederivaten in der Leberzelle zu einer Steigerung der Glukoneogenese. Bei der komplexen multifaktoriellen Pathogenese des Typ-2-Diabetes werden also sowohl die Insulinresistenz als auch die β -Zelldysfunktion durch erhöhte Konzentrationen an Fettsäuren verstärkt ([Lipotoxizität]; Prentki und Nolan 2006, Spinass und Lehmann 2001).

Neben der Beteiligung einer Adipositas an der Entstehung des Typ-2-Diabetes durch die verstärkte Freisetzung freier Fettsäuren werden außerdem vom Fettgewebe sezernierte bioaktive Moleküle, die Adipokine, wie Leptin, TNF- α , Adiponektin, RBP4 und MCP-1 und auch mit ihnen in Zusammenhang stehende Entzündungsprozesse für die Entstehung/Förderung der Insulinresistenz verantwortlich gemacht (Kasuga 2006).

3.5 Physiologische Insulinsekretion durch die pankreatische β -Zelle

Insulin wird beim gesunden Menschen auf sehr präzise Art und Weise von den β -Zellen freigesetzt, angepasst an den jeweils akuten Bedarf um den Blutzuckerspiegel in einem Bereich zwischen 4 mmol/l und 5 mmol/l zu halten (Pfeiffer 2000). Um dies zu gewährleisten, unterliegt die Insulinsekretion einer sehr strengen Kontrolle. Sie erfolgt hauptsächlich durch die Glukose selbst, jedoch sind noch eine ganze Reihe anderer metabolischer, neuraler und hormoneller Faktoren daran beteiligt. Damit diese stimulatorischen und inhibitorischen Einflüsse

aufeinander abgestimmt werden können, verfügen die β -Zellen über eine erstaunlich komplexe Stimulus-Sekretions-Kopplung (Henquin 2004). Im Folgenden sollen nur die involvierten stimulatorischen Hauptmechanismen kurz dargestellt werden. Des Weiteren wird speziell auf den Einfluss von Fettsäuren auf die Insulinsekretion eingegangen. Eine detaillierte Übersicht aller beteiligten, auch der inhibitorischen Mechanismen findet sich z.B. bei Henquin 2004 oder Doyle und Egan 2003.

3.5.1. Glukose-induzierte Insulinsekretion

Unter physiologischen Bedingungen führt Glukose zu einem Anstieg der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[(\text{Ca}^{2+})_i]$ in β -Zellen. Der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist - wie bei der Vermittlung unzähliger anderer zellulärer Antworten auf einen extrazellulären Stimulus- der auslösende Reiz (das „Triggersignal“) für die Freisetzung von Insulin. Dies gilt heute als eindeutig bewiesen (Alberts et al. 2004, Henquin et al. 2003). Der Mechanismus, über den Glukose den Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bewirkt, ist bereits gut erforscht (vgl. Abb. 1): Bei Anstieg des Glukosespiegels im Blut wird proportional dazu, mittels eines spezifischen Glukosetransporters (GLUT-2), Glukose in die β -Zelle aufgenommen und dort durch die inselspezifische Glukokinase phosphoryliert, in die Glykolyse eingeschleust und über Zitratzyklus und Atmungskette unter endständiger Bildung von ATP metabolisiert (Malaisse 1996, Matschinsky 1996). Der Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses führt zu einer Schließung ATP-abhängiger Kalium-Kanäle (K_{ATP} -Kanäle) und damit zu einer Depolarisation der Plasmamembran (Ashcroft und Gribble 1999, Rorsman 1997). Die Depolarisation wiederum führt zu einer Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (VDCC vom L-Typ), was einen Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle zur Folge hat. Der resultierende Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Zelle induziert die Exozytose von Insulin („triggering pathway“; Mears 2004, Gilon und Henquin 1992).

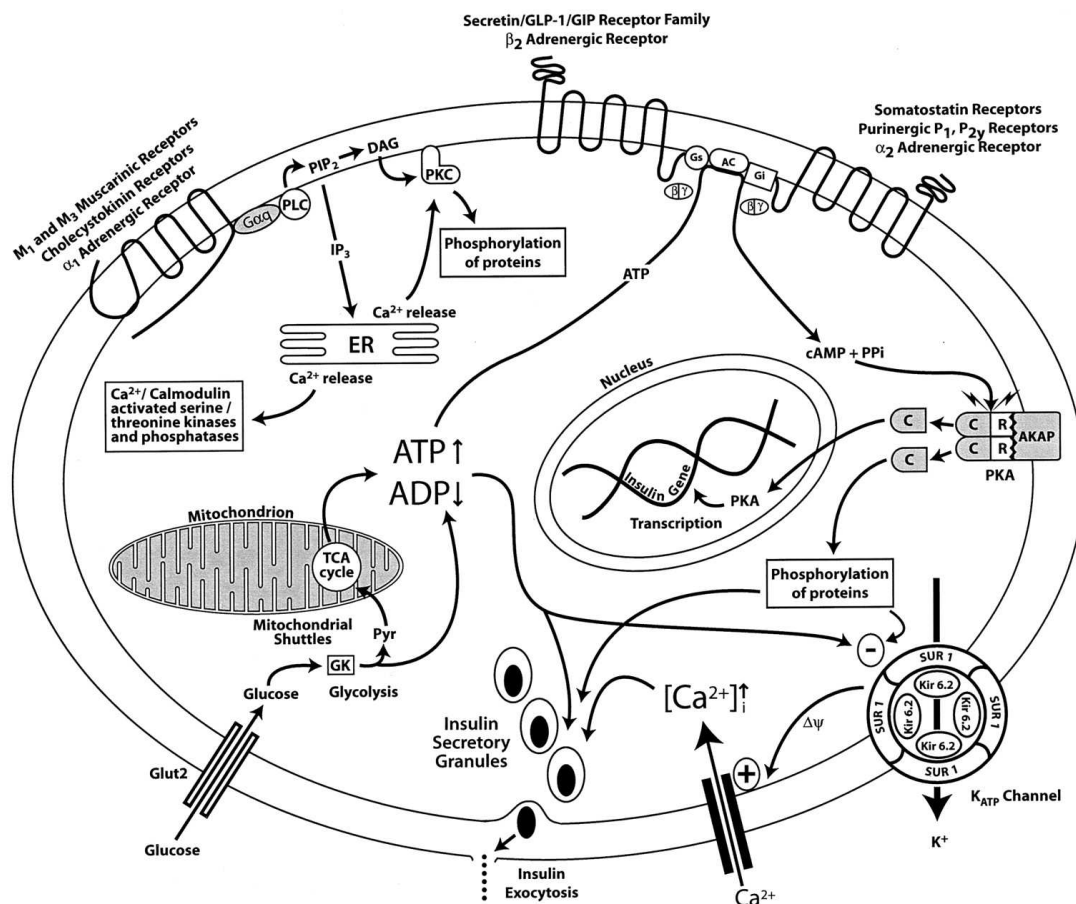


Abb. 1: Schematische Darstellung einiger Hauptmechanismen der Insulinsekretion in der pankreatischen β -Zelle (Doyle und Egan 2003)

Stimulatorische Mechanismen der Insulinsekretion: Glukose wird durch GLUT-2-Transporter in die β -Zelle aufgenommen. Über Glykolyse, Zitratcyclus (TCA cycle) und Atmungskette wird sie metabolisiert und steigert letztendlich die Bildung von ATP aus ADP. Die Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses führt zur Schließung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen mit resultierender Depolarisation der β -Zellmembran. In Folge dessen öffnen sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und es kommt zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, die das entscheidende Signal für das Auslösen der Exozytose des in Vesikeln gespeicherten Insulins darstellt.

Ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ kann auch durch Mobilisierung aus intrazellulären Speichern über Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren erfolgen. Die Aktivierung von G α_q -gekoppelten Rezeptoren wie z.B. α_1 adrenerge oder muskarinische Rezeptor-Liganden führt über eine PLC-Aktivierung zur Hydrolyse von PIP₂ zu IP₃ und DAG. IP₃ setzt im ER gespeichertes Ca^{2+} frei, wodurch es zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ kommt. DAG aktiviert im Zusammenwirken mit Ca^{2+} die PKC, die einerseits die Ca^{2+} -Empfindlichkeit des Sekretionsapparates erhöht andererseits aber wahrscheinlich auch einen Ca^{2+} -Einstrom durch VDCC vom L-Typ ermöglicht. Infolge dieser Prozesse kommt es zur Freisetzung von Insulin. Das G_s-Protein ist z.B. an β_2 -adrenerge Rezeptoren gekoppelt, bei denen die Ligandenbindung zur Aktivierung der AC führt, die cAMP aus ATP synthetisiert. In der Folge kommt es zur PKA-Aktivierung, die wiederum eine Signalkaskade auslöst, in der verschiedene Proteine phosphoryliert werden. Es resultiert eine Erhöhung der Glukose-induzierten Insulinsekretion, die in jedem Fall u.a. auf einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ durch Einstrom von Ca^{2+} durch VDCC beruht. Ebenso kommt es zu einer Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die die Promoteraktivität des Insulin-Gens erhöhen und damit die Insulinsekretion langfristig beeinflussen. Viele inhibitorische Faktoren der Insulinsekretion, z.B. Adrenalin, Noradrenalin, Galanin und Somatostatin, wirken über die AC-inhibierenden G α_i -gekoppelten Rezeptoren.

Neben dem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in der β -Zelle löst Glukose weitere Signale aus, die die Wirkung von Ca^{2+} auf den Exozytose-Prozess K_{ATP} -Kanal-unabhängig noch verstärken („amplifying pathway“). Die dahinter stehenden Mechanismen und deren intrazelluläre Ziele sind bislang allerdings noch nicht eindeutig identifiziert worden (Henquin 2004).

Bis vor kurzem ist davon ausgegangen worden, dass dieselbe duale Regulation auf alle Nährstoffe zutrifft, die in der β -Zelle aktiv metabolisiert werden und das ATP/ADP-Verhältnis erhöhen (Henquin 2004). Hierzu zählen neben Aminosäuren auch Fettsäuren (siehe 3.5.4).

3.5.2 Exkurs: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

3.5.2.1 Struktur und Aktivierung

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) stellen die größte Familie der Zelloberflächen-Rezeptoren dar. Sie leiten extrazelluläre Signale über Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) in das Zellinnere weiter (Signaltransduktion) und sind im Rahmen der Insulinsekretion wichtige Vermittler rezeptoraktivierender Signalmoleküle (Luttrell 2006, Oh da et al. 2006, Doyle und Egan 2003). Charakteristische Strukturmerkmale der GPCRs sind: sieben die Zellmembran durchspannende Helixstrukturen, eine extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne und eine intrazelluläre Domäne, die für die Interaktion mit G-Proteinen verantwortlich ist (Pierce et al. 2002, Teller et al. 2001, Meng und Bourne 2001).

Die **Aktivierung eines GPRC** verläuft folgendermaßen: Im inaktiven Zustand bindet an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors ein aus drei Untereinheiten - α , β und γ - bestehendes G-Protein, wobei die α -Untereinheit GDP gebunden hält. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor induziert eine Konformationsänderung, die bewirkt, dass das GDP freigesetzt wird und an dessen Stelle GTP tritt. Dieser Austausch führt dazu, dass das G-Protein in zwei aktivierte Komponenten dissoziiert, eine α -Untereinheit und einen $\beta\gamma$ -Komplex. Die beiden aktivierten Untereinheiten sind für die weitere Signaltransduktion

verantwortlich und aktivieren oder deaktivieren zell- oder membranständige Effektorenzyme, die entsprechende Vorläufer-Moleküle in aktive *second messenger* umwandeln.

3.5.2.2 G-Protein-Subfamilien

Die namengebenden α -Untereinheiten der G-Proteine lassen sich anhand ihrer Effektorkopplung und der daraus resultierenden unterschiedlichen zellbiologischen Antworten in die $G\alpha_q$ -, $G\alpha_s$ -, $G\alpha_i$ und $G\alpha_{12}$ -Subfamilien einteilen (Thompson et al. 2005, Wettschurek und Offermanns 2005), von denen in der β -Zelle drei vorkommen: die PLC-aktivierende $G\alpha_q$ -, die Adenylatcyclase-aktivierende $G\alpha_s$ -, und die Adenylatcyclase-inhibierende $G\alpha_i$ -Subfamilie (Wettschurek und Offermanns 2005, Doyle und Egan 2003).

3.5.2.3 Funktionelle Charakteristika von GPCRs

GPCRs antworten auf aktivierende Liganden in einer konzentrationsabhängigen Weise, so dass die Agonisten-Konzentration die weitergeleitete Signalwirkung kontrolliert. Dieser Mechanismus mündet in einer für jeden Rezeptor und jeden Agonisten individuellen, maximal effektiven Agonisten-Konzentration. Sind alle Rezeptoren mit einem Agonisten besetzt, kann auch die Addition eines anderen Rezeptor-Agonisten keine weitere Erhöhung der Signalwirkung mehr erreichen (Gainetdinov et al. 2004). Ist eine GPCRs-Klasse über eine ausgedehnte Zeitspanne einer hohen Konzentration eines stimulierenden Liganden ausgesetzt, kommt es zu einem Vorgang, der einzelne Rezeptoren inaktiviert, der sog. Desensibilisierung, was eine reduzierte zelluläre Antwort auf den Agonisten zur Folge hat (Thompson et al. 2005, Gainetdinov et al. 2004, Bunemann und Hosey 1999, Hausdorff et al. 1990).

3.5.2.4 Liganden, Funktionen, „Orphan-GPCRs“

Genomsequenzprojekte haben die Genfamilie der GPCRs mit ungefähr 720 Genen als eine der größten Genfamilien in unserem Erbgut identifiziert (Lander et

al. 2001, Venter 2001). Etwa die Hälfte dieser Gene gehören zu der Gruppe der Sinnesrezeptoren (Wise et al. 2004). Von den übrigen Rezeptoren waren im Jahre 2005 die physiologischen Liganden von ungefähr 210 Rezeptoren bekannt (Wettschurek und Offermanns 2005). Die rezeptoraktivierenden Liganden sind sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Funktion höchst mannigfaltig (Alberts et al. 2002). Zu ihnen zählen vielfältige Stoffe wie Neurotransmitter, Hormone, parakrin wirksame Agonisten, Chemokine, bakterielle Peptide oder auch Nährstoffe wie Fettsäuren, Aminosäuren oder deren Derivate. Die Superfamilie der GPCRs vermittelt die Antworten für die meisten extrazellulären Signale (Wettschurek und Offermanns 2005, Alberts et al. 2002). GPCRs, deren endogener Ligand und damit auch deren Funktion noch nicht identifiziert werden konnte, werden als „Orphan-GPCR“ bezeichnet (Lin und Civelli 2004, Wise et al. 2004, Lee et al. 2003). Aktuelle Daten zählen noch immer über 100 GPCRs mit unbekanntem Liganden und Funktionen (Rayasam et al. 2007, Schlyer und Horuk 2006).

3.5.2.5 Bedeutung mutierter und Wildtyp-GPCRs für Medizin und Pharmakologie

Viele natürlich vorkommende Mutationen an GPCRs gehen mit einem großen Spektrum von Erkrankungen einher oder disponieren für diese (Spiegel und Weinstein 2005, Thompson 2005, Rana et al. 2001, Spiegel 1998). Sie können sich in einem Funktionsverlust oder einem Funktionsüberschuss der betroffenen Rezeptor-Proteine äußern (Spiegel 2006). Die Untersuchung von Mutationen an GPCRs kann Aufschluss über die Ursachen genetisch bedingter Erkrankungen geben, das Wissen von Rezeptorstruktur und -funktion erweitern und Perspektiven für die Entwicklung neuer Arzneimittel liefern (Spiegel 2006, Thompson et al. 2005, Small et al. 2003).

Aufgrund ihrer funktionell ubiquitären Bedeutung nehmen GPCRs in der modernen Medizin und Pharmakologie eine Schlüsselposition ein: Etwa 30-50% aller bekannten Arzneimittelwirkstoffe, die derzeit auf dem Markt sind, arbeiten über GPCRs oder wirken auf mutationsbedingte Funktionsveränderungen von GPCRs

(Thompson et al. 2005, Alberts et al. 2002, Drews 2000). Die Orphan-GPCRs bergen daher ein enormes Potenzial in sich, Ziel neuer, noch zu entdeckender Wirkstoffe zu werden.

3.5.3 Hormon- und Neurotransmitter-induzierte Insulinsekretion

Das Triggersignal für die Insulinsekretion (ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$) kann auch durch K_{ATP} -Kanal-unabhängige Mechanismen erzeugt oder verstärkt werden. Einige Hormone und Neurotransmitter mobilisieren u.a. auch Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (Holz 2004, Gilon und Henquin 2001, Gromada et al. 1998). Ihre Wirkung vermitteln sie über die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.

3.5.3.1 PLC-gekoppelte Agonisten und Insulinsekretion

Hierzu zählen z.B. die Hormone Arginin-Vasopressin (AVP) und Bombesin, deren Anwesenheit im Pankreas von Ratte und Mensch nachgewiesen wurden (Oshikawa et al. 2004, Piiper et al. 1997, Lee et al. 1995, Varga et al. 1994, Polak et al. 1978) sowie der Neurotransmitter Acetylcholin, der aus parasymphatischen Nervenendigungen im Bereich der Langerhans-Inseln freigesetzt wird (Duttaroy et al. 2004, Gilon und Henquin 2001). Die Wirkung dieser sekretionssteigernden Modulatoren im Rahmen der endokrinen, parakrinen oder neurokrinen Regulation der Insulinsekretion ist Glukose-abhängig, d.h. in Abwesenheit oder bei niedrigen Glukosekonzentrationen besitzen sie keine oder nur geringe insulinfreisetzende Wirkung (Henquin 2004, Gilon and Henquin 2001, Zawalich 1996). Eine Bindung der Agonisten an ihre spezifischen Rezeptoren -z.B. muskarinische oder α -1 adrenerge Rezeptoren (siehe Abb. 1)- führt durch Kopplung an $G\alpha_q$ zu einer Stimulation der Phospholipase C (PLC), die membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die beiden *second messenger* Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) spaltet (Thompson et al. 2005, Doyle und Egan 2003, Alberts 2002). IP_3 setzt im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gespeichertes Ca^{2+} frei, wodurch es zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ kommt. DAG aktiviert zusammen mit Ca^{2+} die Proteinkinase C (PKC), die die

Ca²⁺-Empfindlichkeit des Sekretionsapparates erhöht (Gilon und Henquin 2001, Jones und Persaud 1998). Andererseits wird auch ein -wahrscheinlich mit der PKC im Zusammenhang stehender- Ca²⁺-Einstrom durch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle (VDCC) vom L-Typ beobachtet. Diese Prozesse führen zur Exozytose von Insulin (Wettschurek und Offermanns 2005, Gilon and Henquin 2001, Arkhammar 1994).

3.5.3.2 Adenylatcyclase-gekoppelte Agonisten und Insulinsekretion

In der β -Zelle wird die AC-Aktivierung unter normalen physiologischen Bedingungen hauptsächlich durch die gastrointestinalen Hormone *glucose dependent insulinotropic factor* (GIP) und *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) vorgenommen, die nach Nahrungsaufnahme aus endokrinen Zellen des distalen Ileum und Kolon freigesetzt werden (Kieffer 2004, Doyle und Egan 2003, Drucker 2001, Ebert und Creutzfeldt 1987). Die Tatsache, dass oral aufgenommene Glukose zu einer deutlich höheren Insulinsekretion führt als eine vergleichbare Menge parenteral applizierter Glukose, verdeutlicht deren potenzierenden Einfluss auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion (Ebert und Creutzfeldt 1987, Sharp 1979). Die Bindung der Hormone an ihre G α_s -gekoppelten Rezeptoren aktiviert die AC, die cyclisches AMP (cAMP) aus ATP synthetisiert (Straub und Sharp 1996). Die Erhöhung der cAMP-Konzentration in der β -Zelle kann zwar Ionenkanäle in der Plasmamembran direkt aktivieren, hauptsächlich übt es seine Wirkungen jedoch über Aktivierung der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA) aus. Die Aktivierung von PKA löst eine Signalkaskade aus, in der die Phosphorylierung vesikulärer und membranständiger Proteine, VDCC und möglicherweise anderer Ionenkanäle und vielleicht sogar des GLUT-2-Transporters, zu einer Erhöhung der Glukose-induzierten Insulinsekretion führt. Definitiv wird jedoch auch hier ein Anstieg der [Ca²⁺]_i beobachtet, der auf einem Einstrom von Ca²⁺ durch VDCC beruht (Jones und Persaud 1998, Holz et al. 1995, Islam et al. 1995). Außerdem führt die PKA-Aktivierung zu einer Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, die die Promoteraktivität des Insulin-Gens erhöht und damit die Insulin-Neogenese und Insulinsekretion langfristig beeinflussen (Jones und Persaud 1998).

3.5.4 Fettsäuren und Insulinsekretion

3.5.4.1 Wirkungen von Fettsäuren auf die Insulinsekretion

Im Blut ist der Hauptanteil der Fettsäuren (FS) an Serumalbumin gebunden, was den Transport großer Mengen dieser relativ wasserunlöslichen Moleküle ermöglicht. Nur eine kleine FS-Fraktion (< 0,01%) dissoziiert jedoch vom Protein und befindet sich in monomerer Form innerhalb der wässrigen Phase. Es gibt Hinweise darauf, dass eben diese ungebundene Fraktion der FS Effekte auf die Insulinsekretion ausübt (Warnotte et al. 1999). Während der Ausdruck „freie Fettsäuren“ (FFS) traditionell Fettsäuren beschreibt, die unverestert, d.h. nicht an ein Glycerin gebunden sind, wird jedoch neuerdings nur noch die nicht an Albumin gebundene FS-Fraktion darunter verstanden (Warnotte et al. 1999, Spector und Fletcher 1978, Spector 1975).

Die Effekte von Fettsäuren (FS) auf die Insulinsekretion sind komplex und divergent: Während chronisch erhöhte Konzentrationen freier Fettsäuren (FFS) die β -Zellfunktion schädigen und dadurch wesentlich zur Verschlechterung und zum Fortschreiten des Typ-2-Diabetes beitragen (Kahn et al. 2006, Kasuga 2006, Prentki und Nolan 2006), stimulieren akut erhöhte FFS-Spiegel die Insulinfreisetzung und sind essentiell für die von anderen Nährstoffen induzierte Insulinsekretion nach längeren Fastenperioden (Dobbins et al. 1998a, 1998b, Stein et al. 1996, Malaisse und Malaisse-Lagae 1968). Zusätzlich gibt es eine Reihe von Hinweisen auf die zentrale Steuerungsfunktion, die FFS im Rahmen der Nährstoff-induzierten Insulinsekretion zukommt (Gravena et al. 2002, Prentki 1996, Newgard und McGarry 1995).

3.5.4.2 Insulinotrope Effekte akut erhöhter Fettsäurespiegel - Wirkmechanismen

Obwohl die stimulatorischen Effekte akut erhöhter Fettsäurespiegel seit langem bekannt sind (Malaisse und Malaisse-Lagae 1968, Seyffert und Madison 1967), existierten bis vor kurzem bezüglich der dahinter stehenden Wirkmechanismen vor

allem die beiden im folgenden grob umrissenen Hypothesen nebeneinander (Remizov et al. 2003).

Beide Hypothesen, zum einen die sog. „fuel hypothesis“ (Malaisse et al. 1979, Newgard und McGarry 1995), zum anderen die „malonyl-CoA/cytosolic fatty acid hypothesis“ (Prentki et al. 1997, Prentki 1996), die in Abb. 2 schematisch nebeneinander dargestellt sind, basieren auf der Annahme, dass FFS zur Wirkungsentfaltung in die β -Zelle aufgenommen werden müssen.

Nach der „fuel hypothesis“ beschreiten FFS und andere Nährstoffe wie Glukose den „ K_{ATP}/Ca^{2+} pathway“, um die Insulinsekretion zu stimulieren. Zum intrazellulären Abbau der FFS kommt es bei geringem Glukoseangebot. Die FFS werden intrazellulär zunächst zu aktivierten Fettsäuren, den Acyl-CoA, verestert und treten in die Mitochondrien ein, wo sie abgebaut werden. Hierdurch wird letztendlich das zytosolische ATP/ADP-Verhältnis erhöht, was einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ verursacht, wodurch die Insulinfreisetzung ausgelöst wird (Remizov et al. 2003, Newgard und McGarry 1995, Ashcroft und Rorsman 1990). Da jedoch nicht alle Aspekte der Nährstoff-induzierten Insulinsekretion durch den „ K_{ATP}/Ca^{2+} pathway“, der den „triggering pathway“ der Insulinsekretion beschreibt, erklärt werden konnten, wurde noch die zweite Hypothese vorgeschlagen.

Nach der „malonyl-CoA/cytosolic fatty acid hypothesis“ kommt es im Falle höherer Glukosekonzentrationen zum bevorzugten Abbau der Glukose. Die resultierende Erhöhung der Malonyl-CoA-Konzentration führt zur Hemmung der Carnitin-Palmitoyltransferase-I (CPT-I), die den Transport der Acylgruppe in die Mitochondrien katalysiert (Farfari et al. 2000, Chen et al. 1994, Corkey et al. 1989). Dadurch wird die FFS-Oxidation in den Mitochondrien gehemmt, und es kommt zu einer Ansammlung von den Acyl-CoAs im Zytosol, in dessen Folge die Glukose-induzierte Insulinsekretion über verschiedene Mechanismen verstärkt wird. Diskutiert werden z.B. die Acylierung von Proteinen, die die Aktivität von Ionen-Kanälen regulieren (Deeney et al. 2000, Yaney und Corkey 2003), die Aktivierung von PKC-Isoformen (Yaney und Corkey 2003), die v.a. auch einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zur Folge haben sollen (Warnotte et al. 1994) sowie fördernde Effekte auf den Exozytoseprozess selbst (Deeney et al. 2000, Pfanner et al. 1989).

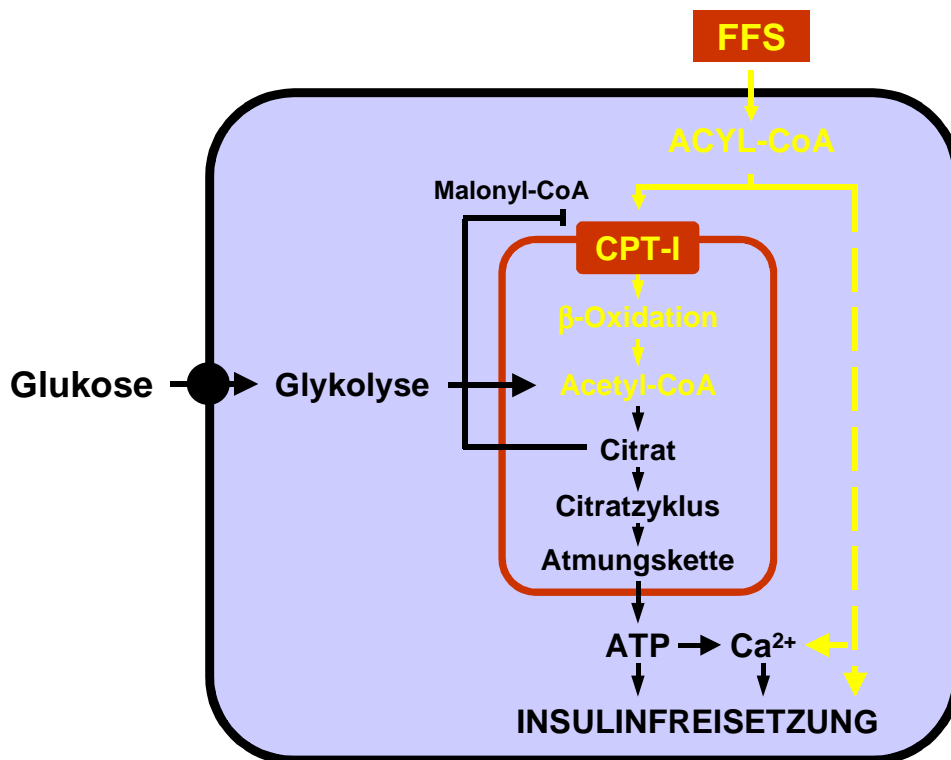


Abb. 2: Schema der von Remizov et al. 2003 zusammengefassten Hypothesen der Wirkmechanismen, über die akut erhöhte Spiegel freier Fettsäuren (FFS) zur Stimulation der Insulinfreisetzung beitragen

In beiden Hypothesen wird davon ausgegangen, dass die FFS zur Entfaltung ihrer insulinotropen Wirkung in die β -Zelle aufgenommen werden müssen, wo sie bei geringem Glukoseangebot im Rahmen der „fuel hypothesis“ in den Mitochondrien (rot umrandeter Bereich) abgebaut werden. Hierdurch entsteht letztendlich ATP und der für Glukose bekannte „ K_{ATP}/Ca^{2+} pathway“ wird beschrieben. Der folgende Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in der Zelle ist das auslösende Signal für die Insulinsekretion. Bei höherer Glukosekonzentration wird laut der „malonyl-CoA/cytosolic fatty acid hypothesis“ auch bevorzugt Glukose abgebaut. Die daraus resultierende Erhöhung der Malonyl-CoA-Konzentration führt zur Hemmung der CPT-I und damit der β -Oxidation, wodurch es zu einer Ansammlung von Acyl-CoAs im Zytosol (blauer Bereich außerhalb des roten Rahmens) kommt, die über verschiedene Mechanismen (u.a. einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$) zur Verstärkung der Glukose-induzierten Insulinsekretion beiträgt.

Während bis 2003 hauptsächlich diese beiden metabolischen Ansätze zur Erklärung der stimulatorischen Wirkung freier Fettsäuren auf die Insulinsekretion existierten (Remizov et al. 2003), die z.T. heute noch vertreten werden (Haber et al. 2006, Nolan et al. 2006), fanden sich zu Beginn dieses Projektes in der Literatur jedoch widersprüchliche Untersuchungsergebnisse, die beide Hypothesen in Frage stellten (Remizov et al. 2003): Zum einen führte die Blockierung der mitochondrialen Aufnahme von Acyl-CoAs durch Hemmung der CPT-I in HIT-T15 und primären β -Zellen der Maus zu einer deutlichen Reduktion

(Hemmung der CPT-I mit Methylpalmoixirat) bzw. zu einem kompletten Verschwinden (Hemmung der CPT-I mit 2-Bromopalmitat) FFS-induzierter Ca^{2+} -Signale bei Glukosekonzentrationen von 5 mM und 10 mM. Entsprechend der „malonyl-CoA/cytosolic fatty acid hypothesis“ wäre bei erhöhter Glukosekonzentration aber ein weiterer Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu erwarten gewesen. Zum anderen zeigte auch die Hemmung von Protein-Acylierungsprozessen durch Cerulenin keinen Einfluss auf die FFS-induzierten Ca^{2+} -Signale, was zeigt, dass diese nicht an der Generation der Signale beteiligt zu sein scheinen. Beide Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der „malonyl-CoA/cytosolic fatty acid hypothesis“ und weisen auf die Wichtigkeit des mitochondrialen Abbaus für die Wirkungsentfaltung der Fettsäure hin.

Gleichzeitige Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und des mitochondrialen Membranpotenzials als Maß für die ATP-Produktion gaben keinen Hinweis auf eine erhöhte, eher sogar auf eine herabgesetzte ATP-Produktion als Antwort auf Palmitat (Remizov et al. 2003). Insgesamt präsentierten diese Untersuchungsergebnisse also ein Bild, das die bis dato bestehenden FFS-Wirkhypothesen in Frage stellt und nach einem alternativen Wirkmechanismus verlangt, über den akut erhöhte Spiegel freier Fettsäuren ihre stimulatorische Wirkung auf die Insulinsekretion ausüben.

3.6 Deorphanisierung von GPR40

Bereits seit einigen Jahren waren die Existenz und der Genort des G-Protein gekoppelten Rezeptors GPR40 bekannt (Sawzdargo et al. 1997), jedoch zählte er zunächst zu den Orphan-GPCRs, da weder seine Funktion noch seine Liganden bekannt waren. Die Deorphanisierung von GPR40 erfolgte im Jahr 2003 parallel durch drei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen (Itoh et al. 2003, Briscoe et al. 2003, Kotarsky et al. 2003). Um die Liganden für den Rezeptor zu identifizieren wurden humane, Ratten- und Mäuse-GPR40 cDNA heterolog in Reporter-Zellen exprimiert und mit bis zu über 1500 verschiedenen chemischen Verbindungen behandelt. Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden als Maß für die Wechselwirkung mit dem Rezeptor gedeutet. Dabei zeigte sich, dass ein großes Spektrum gesättigter, einfach und mehrfach ungesättigter mittel- und langkettiger FFS mit mehr als 6 C-

Atomen den Rezeptor in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise aktivierten, während kurzkettige Fettsäuren mit 6 oder weniger C-Atomen nicht zur Rezeptoraktivierung führten. Bezüglich der Wirkungen einzelner FFS und ihrer halb-maximalen effektiven Konzentration (EC_{50}) und der Potenz, mit der sie den Rezeptor aktivieren, existieren einige Widersprüchlichkeiten, jedoch liegen die berichteten EC_{50} im mikromolaren Bereich (Briscoe et al. 2003, Itoh et al. 2003, Kotarsky et al. 2003).

Mittels GPR40-Expressionanalysen wurde festgestellt, dass GPR40 am stärksten im Pankreas von Ratte und Mensch, hier vornehmlich in den Langerhans-Inseln und auch in verschiedenen murinen pankreatischen β -Zelllinien exprimiert ist (Briscoe et al. 2003, Itoh et al. 2003, Kotarsky et al. 2003). Eine der Arbeitsgruppen beschreibt auch eine starke GPR40-Expression im menschlichen Gehirn (Briscoe et al. 2003), während die beiden anderen Arbeitsgruppen dies nicht bestätigen (Kotarsky et al. 2003, Itoh et al. 2003).

Diese Zusammenhänge legten nahe, dass einige physiologische Effekte von FFS in pankreatischen β -Zellen und evtl. auch im Gehirn über den Zelloberflächen-Rezeptor GPR40 vermittelt werden und lieferten damit einen neuen Ansatzpunkt auf der Suche nach einem alternativen Wirkmechanismus, über den akut erhöhte Spiegel freier Fettsäuren ihre stimulatorische Wirkung auf die Insulinsekretion ausüben.

3.7 Ziele der Untersuchungen

Die Insulinsekretion *in vivo* ist ein multifaktorieller und komplexer Prozess, an dem eine Vielzahl von Signalen beteiligt ist, deren Wirkmechanismen z.T. bis heute noch nicht geklärt oder aufgedeckt werden konnten. Vor dem Hintergrund der Bedeutung einer funktionierenden Insulinsekretion für die Gesunderhaltung und der weltweiten drastischen Zunahme von Typ-2-Diabetes steht außer Frage, dass die Bemühungen um ein besseres Verständnis der mit der Erkrankung in Zusammenhang stehenden grundlegenden Mechanismen verstärkt werden müssen, um neue Ansatzpunkte für verbesserte Behandlungsmöglichkeiten und zur Bekämpfung des Diabetes zu finden.

Vor dem Hintergrund der dargestellten Zusammenhänge waren die **primären Ziele dieser Arbeit:**

- die Bedeutung von GPR40 für die Generation Fettsäure-induzierter Ca^{2+} -Signale
- und die Bedeutung von GPR40 für die Fettsäure-stimulierte Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen *in vitro* im murinen Modell zu klären.

Des Weiteren ergab sich im Verlauf der Arbeit aus den Untersuchungsergebnissen eine neue Fragestellung mit klinischem Bezug.

Wie bereits erwähnt, kommt der Genetik bei der Entstehung des Typ-2-Diabetes eine große Bedeutung zu. Erhebliche Anstrengungen werden und wurden unternommen, die in der Pathogenese des polygenetisch bedingten Typ-2-Diabetes beteiligten Gene zu identifizieren. Obwohl bereits mehrere potentiell wichtige Regionen identifiziert werden konnten (Dugi et al. 1999), stehen eindeutige Erfolge bei der Suche nach potentiellen Kandidaten-Genen, die in der Entwicklung einer Insulinresistenz oder einer gestörten Insulinsekretion eine Rolle spielen könnten noch aus (Kasuga 2006). Für den GPR40-Rezeptor sind zwei beim Menschen natürlich vorkommende Mutationen beschrieben worden (Ogawa et al. 2005, Hamid et al. 2005).

Daher sollte als **sekundäres Ziel dieser Arbeit** geklärt werden,

- ob die beim Menschen beschriebenen, natürlich vorkommenden GPR40-Mutationen zu einer Funktionsänderung des GPR40-Rezeptors führen und damit möglicherweise im Zusammenhang mit der Entstehung des Typ-2-Diabetes stehen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Gerät	Typ, Firma
Agarosegelelektrophorese	Life Technologies Horizon 58 mit Model 200 Electrophoresis Power Supply, Gibco BRL Horizon 11.14, Gibco BRL
Bakterieninkubator	B 6120, Heraeus Instruments
Bunsenbrenner	Schütt Flammy-L 03068L, Schütt Labortechnik GmbH
CO ₂ -freier Inkubator	B 6030, Heraeus Instruments
CO ₂ -Inkubator	Function Line, Heracell 150, Heraeus Instruments
Feinwaage	MC1 Analytic AC 210 S, Sartorius
Geldokumentationsgerät	Geldoc 2000, Biorad
Handzähler	Omnilab
Kartuschenbrenner	VWR International
Kühleinrichtungen	4°C -20°C -80°C -196°C
	KP 3660 INDEX 20 A, Liebherr
	GSP 30420, Bosch; Gefrierraum
	Profiline Taunus, National Lab GmbH
	M 250 (Flüssigstickstofftruhe) mit XL-100 (Nachfülltank), Taylor-Wharton
Magnetrührer	MR 2000, Heidolph
Mikroskope	Axiovert 100, 135 IM und 200 M, Zeiss
Mikrowelle	MW 7800, Severin
pH-Meter	Calimetric 743, Knick
Pipettensatz	Reference, Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus-Akku, Hirschmann
Real-Time-Block-Thermocycler	ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems
Sequenzierer	MegaBACE1000 Sequence Analyzer, Amersham Biosciences
Schüttelinkubator	Typ HT Aerotron, INFORS AG
Sterilbank	LaminAir HB 2448, Heraeus
Thermocycler	Mastercycler 5330 plus, Eppendorf; T-Gradient Thermoblock, Biometra; PTC-200, MJ Research
Thermometer	Roth
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf
Tischzentrifugen	Centrifuge 5415C, Eppendorf; EBA 12, Hettich, Universal 320, Hettich
UV-Spektrometer	Ultrospec K, Pharmacia
Victor 1420 Multilabel Counter	Wallac
Vortexer	REAX 2000, Heidolph; Typ 444-1372, VWR International
Waage	Typ 3716, Sartorius; APX-1502, Denver Instruments
Wasserbad mit Schüttelfunktion	Typ 1083, GFL
Zellzählkammer	Neubauer, Brandt
Zentrifugen	Biofuge 13 R mit Rotor Nr. 3757, Heraeus; Multifuge 3-R mit Rotor Nr. 74006445, Heraeus

Spezielle Geräte, die hier nicht aufgelistet sind, werden im Methodenteil beschrieben.

4.1.2 Chemikalien

Chemikalien und Reagenzien	Firma (Bestellnummer)
Agarose ultra pur, Elektrophorese	Gibco BRL (15510-027)
Agar-Agar	Roth
Amocid	Lysoform
Ampicillin (100 mg/ml)	Roche
Arginin-Vasopressin	Sigma
BM-Cyclin	Roche (799050)
Borsäure	Merck
2-Bromopalmitat	Sigma (21604)
Bromphenolblau	Sigma
BSA > 96% fettsäurefrei	Sigma (A6003)
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
DEPC	Roth
D-Glukose	Sigma
DMSO	Roth
DNA Ladder 100 bp	Invitrogen
DNA Ladder 1 kb	Invitrogen
DNA Polymerisationsmix (20 mM je: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Biosciences (27-2094-01)
DTT	Invitrogen
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Elektrophorese Matrix für MegaBACE	Amersham Biosciences (US79676)
Ethanol, reinst und vergällt	Roth
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Invitrogen (15585-011)
FCS, Lot.Nr.: 40Q5621K	Gibco (10270-106)
First Strand Puffer (5-fach)	Invitrogen
Formaldehyd	Merck
Fugene 6 Transfektionsreagenz	Roche (1815091)
Fura-2 AM	Molecular Probes (F1221)
Gene Ruler 100 bp DNA-Ladder	Fermentas
Glycerol	Sigma
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Sigma (H3375)
HEPES flüssig 1 M	Gibco (11360-039)
Immersol 518 F (fluoreszenzfreies Immersionsöl)	Zeiss (444963)
Incidin Extra N	Ecolab
Isopropanol (2-Propanol)	Roth
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumchloridlösung 3 mol/l	Roth
Kollagenase aus Clostridium Hystolyticum ca. 0.5-0,9 U/mg	Serva (17449.03)
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	Fluka (61245)
Laborfett Stirr-Ol, silikonfrei	Schmizo AG
Ladepuffer, Blue/Orange (6x)	Promega
L-Glutamin	Gibco
Loading Dye Solution (6 x)	Fermentas
α -Linolensäure	Sigma (L2376)
γ -Linolensäure	Sigma (L2378)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (11668-019)

Chemikalien und Reagenzien	Firma (Bestellnummer)
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Sigma
Meliseptol, Schnelldesinfektionsmittel	B. Braun AG Melsungen
MEM with Earle's Salts Medium	PAA (E15-024)
2-Mercaptoethanol zur Analyse	Sigma (M7154)
2-Mercaptoethanol 50 mM	Gibco (31350)
Methanol	Roth
MOPS	Sigma
Myristinsäure	Sigma (M3128)
Natriumacetat	Sigma
Natriumcaproat	Sigma (C4026)
Natriumchlorid	Merck (1.06404.1000)
Natriumlaurat	Sigma (L9755)
Natriumlinoleat	Sigma (L8134)
Natriumoleat	Sigma (O7501)
Natriumpalmitat	Sigma (P9767)
Natriumpyruvat MEM 100 mM	Invitrogen (11360)
Natronlauge 1 mol/l	Merck
Nuklease-freies Wasser	Ambion (9938)
Oligo (dT)12-18	Amersham Biosciences
Opti-MEM I serumreduziertes Medium	Gibco (31985)
Palmitinsäure	Sigma
PBS Dulbecco's	Gibco (14190-094)
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 Einheiten/ml)	Gibco (15140)
Pluronic F-127	Molecular Probes
RNAi Fect Transfektionsreagenz	QIAGEN (11668-019)
RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin	Gibco (31870-074)
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin	Gibco (52400-025)
Salzsäure	Merck
Silikonfett Rotisilon C/D	Roth (8537.1)
SOC-Medium	Invitrogen (15522-034)
Steriles Wasser (Ampuwa)	Fresenius
Tris	Merck
Trypanblau für die Mikroskopie	Merck
Trypsin/EDTA	PAA (L11-004)
Verapamilhydrochlorid	Calbiochem (676777)

4.1.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Firma (Bestellnummer)
Biosphere Filter Tips 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt
Cellstar Makroplatten mit 6 Vertiefungen	Greiner Bio-One (657160)
Deckgläschen, rund, Stärke 1, 22 mM Durchmesser	Assistent (1001/0022)
Deckgläschen, rund, Stärke 0, 24 mM Durchmesser	Menzel-Gläser (7606547)
Einfrierbox	NUNC
Enfrierröhrchen 1,5 ml	NUNC
Einmalinjektions-Kanüle Gr. 20, Sterican	B. Braun Melsungen AG
Einmalspritzen, steril, 10 ml, Injekt	B. Braun Melsungen AG
Einmalspritzen, steril, 2 ml, Injekt	B. Braun Melsungen AG
Eppendorf-Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Sarstedt (72690)
Haemazytometer-Deckgläser, Stärke 4,4 mM	Roth (L189.1)
Mikrotiterplatten speziell für die Fluoreszenzanalyse und 8-er Streifen optischer Deckel	Applied Biosystems)
Nunclon 6-well Platten	NUNC (152795)
Pasteurpipetten aus Glas, ca. 230 mM und 150 mm	Brandt GmbH & Co KG
PCR-Platten, 96-well	Sarstedt (72/1979.202)
PCR Tubes, 0,2 ml	Biozym (710920)
Pipettenspitzen alle Größen	Sarstedt
QIAshredder spin columns	QIAGEN (79654)
Serologische Einmalpipetten, wattiert, 5, 10 und 25 ml	Sarstedt
Sterilindikatorband	Roth (8221.1)
Venenverweilkanülen ohne Fixierflügel, Introcan, 14 G /2,2 mm	B. Braun Melsungen AG
Xenon-Lampe, UEL-75XE, 75 Watt	Photomed GmbH
Zellkulturflaschen, Easy Flask, 75 cm ² , Filterdeckel	NUNC (156499)
Zellkulturröhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One (227261)
Zellkulturröhrchen, 14 ml	Greiner Bio-One (187261)
Zellkulturröhrchen, 15 ml	NUNC (366079)
Zellkulturschalen, Falcon 35 x 10 mM style	Becton Dickinson
Zellschaber steril	Sarstedt (831830)

4.1.4 Verwendete Reagenziensätze

Name des Reagenziensatzes	Firma
Brilliant QPCR Master Mix	Stratagene
DNA-free	Ambion
DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems	Amersham Biosciences
Genelute HP Plasmid Midiprep	Sigma
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
Rat insulin ELISA Kit	Crystal Chem. Inc.
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen
VenorGeM-Mykoplasmen-Detektionskit	Minerva Biolabs

4.1.5 Verwende Enzyme

Enzym	Firma
BioTherm Taq DNA Polymerase	Genecraft
Dpn I Restriktionsenzym	Stratagene
PfuTurbo DNA Polymerase	Stratagene
Super Script II Reverse Transcriptase	Invitrogen
Sure Start Taq DNA Polymerase	Stratagene
Thermo Sequenase II DNA Polymerase	Amersham Biosciences

4.1.6 Verwendete Zellen

4.1.6.1 Primäre β -Zellen der Maus

Die β -Zellen wurden jeweils wie unter Abschnitt 4.2.1 beschrieben primär durch Kollagenase-Verdau aus Mäusepankreatata gewonnen. In der vorliegenden Arbeit entstammten diese adulten, 12-16 Wochen alten, gefütterten, weiblichen NMRI-Mäusen (die Abkürzung steht für deren Herkunft aus dem *Naval Medical Research Institute*). Alle Mäuse wurden aus Zuchten des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen, wo sie in einem 12h/12h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten wurden und Standardtrockenfutter und Trinkwasser zur freien Verfügung erhielten. Die Raumtemperatur betrug 24°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55-65%. Die Mäuse wurden durch cervikale Dislokation nach Betäubung getötet (Ausnahmegenehmigung der Bezirksregierung Hannover siehe 8.2).

4.1.6.2 Zelllinien

INS-1: Die Zelllinie INS-1 stammt aus Zellen, die aus einem durch Röntgenstrahlung induzierten Ratteninsulinom isoliert worden waren und wurde von Asfari und Mitarbeitern etabliert (Asfari et al. 1992). INS-1 Zellen zeigen typische morphologische und funktionelle Charakteristika pankreatischer β -Zellen und einen hohen Grad an gewebespezifischer Differenzierung. Der Insulingehalt der INS-1 Zelle beträgt ca. 20% des Wertes nativer β -Zellen und liegt damit weit über dem anderer permanenten β -Zelllinien (Asfari et al. 1992, Praz et al. 1983); die Glukoseresponsivität der Zellen entspricht nahezu dem physiologischen

Bereich. Zusätzlich führt die Stimulation der INS-1 Zellen mit Glukose zur Depolarisation der Zellmembran und geht mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ einher. Die Merkmale der Zellen bleiben über einen Zeitraum von 80 Passagen stabil (Asfari et al. 1992), weswegen sie zu einem verbreiteten β -Zellmodell geworden sind (Hohmeier und Newgard 2004). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Lenzen aus der Abteilung für Klinische Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

HEK-293: Die Zelllinie HEK-293 ist das Transformationsprodukt einer humanen embryonalen Nierenzelle (Human Embryonic Kidney) mit dem Adenovirus Typ 5 (Graham et al. 1977) und zeichnet sich durch gute Transfizierbarkeit aus. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Schaefer aus dem Institut für Pharmakologie der Charité Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt.

4.1.7 Verwendete Primer und TaqMan-Probes

Unmodifizierte Oligonukleotide wurden von der MWG-Biotech GmbH und TIB MOLBIOL bezogen. Die TaqMan-Probes kamen von der biomers.net GmbH. Tabelle 1 enthält die Sequenzen der verwendeten Primer bzw. Probes. Die NCBI Genbank-Zugangsnummern der Zielgene sind: AF539810 für Ratten-GPR40; X02231 bzw. X00972 für Ratten-GAPDH und AF024687 für Human-GPR40 (siehe Anhang 8.4).

Primer	Name	Sequenz von 5' zu 3'
TaqMan-Primer	Rat GPR40 fw (Briscoe et al. 2003)	CCTATAATGCTTCCAATGTGGCTAGT
	Rat GPR40 rv (Briscoe et al. 2003)	CCTGTGATGAGCCCCAACTT
	Rat GAPDH fw (Kelly et al. 2003)	AACCTGCCAAGTATGATGACATCA
	Rat GAPDH rv (Kelly et al. 2003)	TGTTGAAGTCACAGGAGACAACCT
TaqMan-Probes	Rat GPR40-Probe (Briscoe et al. 2003)	TCATAAACCCGGACTTAGAAGGCTCCTGG

Primer	Name	Sequenz von 5' zu 3'
	Rat GAPDH-Probe (Kelly et al. 2003)	TGGTGAAGCAGGCGGCCGA
Mutagenese-Primer	hGPR40Mut1 fw (Mut1: Asp175Asn)	CCTGGAAGCCTGGACCCGGCCTCTGC
	hGPR40Mut1 rv (Mut1: Asp175Asn)	GCAGAGGCCGGGTCCAGGCTCCAGG
	hGPR40Mut2 fw (Mut2: Arg211His)	GGCACTGGCACACTCCGGCCTGACGC
	hGPR40Mut2 rv (Mut2: Arg211His)	GCGTCAGGCCGGAGTGTGCCAGTGCC
Sequenzier-Primer	Seq upper	GTCACCTGGGTCTGGTCTTT
	Seq lower	GATTGGGGTACAGGAAGCTG

Tab. 1: Für TaqMan-PCR-, Mutagenese- und Sequenzierungsreaktionen eingesetzte Primer und Probes

Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Die TaqMan-Probes sind jeweils 5'-FAM + 3'-TAMRA markiert. Die in den mutagenisierenden Primern ausgetauschten Nukleotide im Vergleich zur Originalsequenz sind fett gedruckt und unterstrichen. Die Nukleotide, die zum Einbau einer veränderten Aminosäure im Vergleich zum Wildtyp führen, sind rot hervorgehoben. Die aus technischen Gründen eingefügten stillen Mutationen, die keine Veränderung der Aminosäure zur Folge hatten, sind grün hervorgehoben.

4.1.8 Verwendete siRNAs

Die siRNAs gegen Ratten-GPR40 (GPR40 siRNA) sowie die Negativkontroll-siRNA (NC siRNA, siehe Tab. 2) wurden als „SMART pool package“ auf der Basis der Dharmacon-Kriterien (Dharmacon Inc., U.S.A.) erworben. Sie wurden nach Ankunft entsprechend der Herstellerempfehlung in mitgeliefertem RNase-freiem 1x siRNA Puffer zu einer 20 µM Stammlösung resuspendiert und bis zu ihrem Einsatz in gebrauchsfertigen Aliquots bei -20°C gelagert. Die GPR40 siRNA (siGENOME SMARTpool reagent, Rat GPR40) ist ein Mix aus 4 siRNAs, die alle mit Teilen der Ratten-GPR40 Sequenz übereinstimmen. Die Negativkontroll-siRNA (siCONTROL Non-Targeting siRNA Pool) ist ein Mix aus 4 siRNAs, die keine Entsprechungen im Genom der Ratte hat. Sie wurde eingesetzt, um

unspezifische Effekte der siRNA in der gewählten Konzentration ausschließen zu können (Echeverri et al. 2006, Elbashir et al. 2002).

Interne Bezeichnung	Name des Herstellers	Hersteller/Katalognummer
GPR40 siRNA	siGENOME SMARTpool reagent, Rat GPR40	Dharmacon, Inc. M-080051-00-00-00
NC (negative control) siRNA	SiCONTROL Non-Targeting siRNA Pool,	Dharmacon, Inc. D-001206-13-05

Tab. 2: Verwendete siRNAs

4.1.9 Verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendung	Herkunft
pCDN	hGPR40-Expressionsvektor	Dr. Cilia Briscoe, Department of Metabolic Diseases, GlaxoSmithKline, U.S.A., geheimer Hausvektor der Fa. GlaxoSmithKline, (Briscoe 2003, Aiyar et al. 1994)
pGFP-N1	GFP-Expressionsvektor	Fa. CLONTECH, (Plasmidinformation im Anhang 8.1)

Tab. 3: Verwendete Plasmide

4.1.10 Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> KM 12 JM109	F', traD36, proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB), glnV44 e14 ⁻ , gyrA96, recA1, relA1, endA1, thi, hsdR17	New England BioLabs
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F', proAB, lacIqZΔM15, Tn10, (Tetr)]	Stratagene

Tab. 4: Verwendete *E. coli*-Stämme

4.1.11 Stammlösungen

Die Natriumsalze der Fettsäuren (100 mM) wurden in warmer bis heißer 0.1 N NaOH (Laurat, Myristat, Palmitat, Oleat bei 70°C, alle anderen bei 37°C) gelöst. Handhabung und Lagerung der ungesättigten Fettsäuren erfolgten aufgrund ihrer Oxidationsanfälligkeit unter Stickstoffatmosphäre (Richieri et al. 1993). 2-Bromopalmitat (100 mM) wurde in Methanol gelöst, Arginin-Vasopressin (AVP, 100 µM), CaCl₂ (1M) und Verapamil (100 mM) in Wasser, Fura-2 AM (1 mM) in DMSO. Voruntersuchungen zeigten, dass die eingesetzten Mengen der jeweiligen Lösungsmittel allein keinen Einfluss auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) hatten.

4.2 Methoden

4.2.1 Präparation von primären β-Zellen der Maus

4.2.1.1 Präparation von Langerhans-Inseln

Die Maus wurde durch cervikale Dislokation getötet. Die Tötung erfolgte am zuvor mit CO₂ betäubten Tier. Nach Desinfektion des Bauchfells mit 70%igem Ethanol wurde der Bauchraum mit einem Präparationsbesteck geöffnet, so dass die inneren Organe frei lagen. Anschließend wurde der *Ductus choledochus* knapp unterhalb der Leber abgeklemmt und zwei weitere Klemmen am Duodenum ca. 5 cm rechts und links der *Papilla duodeni vateri* angebracht. Mit Hilfe einer Kanüle wurden nun langsam 2 ml eisgekühlte Kollagenaselösung, bestehend aus 1,1 mg Kollagenase und 2 ml Lösung A (135 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,2 mM MgCl₂, 1,28 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 3 mM Glukose, 0,1% [w/v] BSA, 100 IU Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml, mit 100% O₂ begast, pH 7,4) in den *Ductus pancreaticus* eingespritzt. Dadurch blähte sich das Pankreas stark auf und konnte nach Lösen der Klemmen mit Hilfe einer feinen Schere herauspräpariert werden. Das Organ wurde in ein 10 ml Glasgefäß überführt, in dem sich zusätzlich noch ca. 1 ml der Kollagenaselösung befand. Nun folgte eine 11 minütige Inkubationsphase im Schüttelwasserbad bei 37°C. Durch Zugabe von 8 ml gekühlter (4°C) Lösung A wurde der Verdauungsvorgang im Anschluss daran

gestoppt. Das noch zusammenhängende Pankreasgewebe wurde nun durch vorsichtiges Auf- und Abziehen in einer 10 ml Spritze mechanisch weiter zerteilt und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet erneut in Lösung A resuspendiert. Um die Kollagenaselösung vollständig zu entfernen, erfolgte dieser Waschvorgang drei weitere Male. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Pellet wieder in Lösung A resuspendiert und die Suspension in eine 10 cm Kulturschale gegeben. Unter einem Stereomikroskop konnten die nun freiliegenden Inseln mit Hilfe einer Glaspipette manuell ausgelesen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt werden. Pro Präparation wurden ca. 200-250 Inseln gewonnen.

4.2.1.2 Gewinnung einzelner Inselzellen

Um aus den intakten Inseln einzelne Inselzellen zu gewinnen, wurden die Inseln zunächst pelletiert. Danach folgte die Resuspension des Pellets in Ca^{2+} -freier, EGTA-haltiger Lösung B (135 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,2 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 10 mM HEPES, 3 mM Glukose, 0,1 % [w/v] BSA, 100 IU Penicillin/ml, 100 μg Streptomycin/ml, mit 100 % O_2 begast, pH 7,4) unter gutem Mischen mit Hilfe eines Vortexers und anschließender Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur in der Lösung. Dann folgte eine 1 minütige Zentrifugation bei 400 rpm, die Entfernung des Überstands unter sterilen Bedingungen und die Resuspension des Pellets in ca. 1 ml β -Zell-Kulturmedium (siehe 4.2.2.1). Durch 30-maliges Auf- und Abpipettieren mit Hilfe einer rundgeschmolzenen, eingeeengten Glaspipette wurden die Inseln in eine Zellsuspension überführt, die für die Ca^{2+} -Messungen gleichmäßig auf sterile Deckgläschen verteilt wurde, von denen sich je eines in einer 35 mm Kulturschale befand. Für je 10 Inseln wurde ein Deckgläschen bereitgestellt. Die Kulturschalen wurden zunächst für 2-3 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 in den Brutschrank gestellt, um ein Anwachsen der Zellen auf dem Deckgläschen zu ermöglichen. Im Anschluss daran wurde jede Kulturschale vorsichtig mit 2 ml Medium aufgefüllt. Die Primärkultur konnte so bis zu 3 Tagen in Kultur gehalten bzw. zu Messzwecken verwendet werden.

4.2.2 Allgemeine Zellkulturverfahren

4.2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die **primären β -Zellen der Maus** wurden nach der Präparation direkt auf Glasdeckgläschen ausgesät, von denen je eines in eine 35 mm Kulturschale gelegt wurde. Diese wurden mit je 2 ml Kulturmedium bedeckt, bestehend aus RPMI 1640 Grundmedium (Gibco, Best. Nr.: 52400-025) inkl. 2 mM L-Glutamin und 25 mM HEPES mit Zusatz von 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem (45 Min. bei 56°C) fötalem Kälberserum (FCS), 100 U Penicillin/ml und 100 μ g Streptomycin/ml und konnten so bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung unter sterilen Bedingungen bis zu 3 Tagen in Kultur gehalten werden.

Die **Zelllinien INS-1** und **HEK-293** wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche und Filterdeckel in 20 ml Kulturmedium bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung unter sterilen Bedingungen als Monolayer kultiviert. Das verwendete Medium für INS-1 Zellen war RPMI 1640 (Gibco, Best. Nr.: 31870-025) mit Zusatz von 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 50 μ M β -Mercaptoethanol. Für die HEK-293 Zellen wurde MEM-Earle's Medium (PAA, Best. Nr.: E-15-024) mit Zusatz von 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS und 2 mM L-Glutamin verwendet. Das Medium wurde jeweils alle 2-3 Tage gewechselt. *Hinweis: Im Umgang mit INS-1 Zellen ist besonders zu beachten, dass deren biologisches Verhalten (Asfari et al. 1992) stark von der verwendeten FCS-Charge abhängt (Sekine et al. 1997 und eigene Erfahrungen), so dass bei gut funktionierenden INS-1 Zellen möglichst die Serumcharge nicht mehr geändert werden sollte.*

4.2.2.2 Passagieren von Zellen

Um einen Wachstumsstopp durch Kontaktinhibition bei den Zelllinien zu vermeiden, wurden die Zellen in Abhängigkeit von ihrem Wachstumsverhalten verdünnt und neu ausplattiert bzw. die für die Experimente benötigten Zellen ausgezählt und ausgesät. Die Passage der INS-1 Zellen für die Subkultivierung erfolgte in der Regel einmal wöchentlich im Verhältnis 1:5. Die HEK-293 Zellen

wurden alle 2-4 Tage je nach Bedarf im Verhältnis 1:5 bis 1:20 gesplittet. Zum Ablösen der Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml sterilem 1x PBS gewaschen und mit 3 ml 0,25% Trypsin/1 mM EDTA bis zum vollständigem Ablösen von der Flaschenwand, was mikroskopisch kontrolliert wurde, inkubiert. Je nach gewünschtem Verdünnungsgrad und Bedarf wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert oder auch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und in neue Zellkulturflaschen bzw. auf Deckgläschen, die in 35 mm- Kulturschalen oder in 6-Well-Platten lagen, ausgesät. Zellen von jungen Passagen wurden verstärkt hochgezogen und eingefroren und konnten bei Bedarf wieder eingesetzt werden.

4.2.2.3 Einfrieren von Zellen

Die mit Trypsin abgelösten Zellen wurden gezählt, für 5 Min. bei RT und 500 x g zentrifugiert, vom alten Medium befreit, in Einfriermedium resuspendiert und je nach vorhandener bzw. gewünschter Zellzahl pro Röhrchen auf entsprechend viele Einfrierröhrchen verteilt, so dass sich je 1 ml Zellsuspension in jedem Röhrchen befand. Das Einfriermedium für INS-1 Zellen bestand aus 60 % INS-1 Medium (s.o), 30 % hitzeinaktiviertem FCS und 10 % DMSO.

Das Vorgehen für die HEK-293 Zellen war etwas anders: nach dem Entfernen des alten Mediums wurden die Zellen zunächst in 1 ml reinem FCS pur resuspendiert und anschließend tropfenweise 1 ml 20 % DMSO in FCS zugegeben. Nachdem alles durch Pipettieren gut vermischt wurde, konnte die so entstandene Zellsuspension auf 2 Einfrierröhrchen verteilt werden. Es folgte das stufenweise Herunterfrieren der Zellen. Zunächst lagerten sie für mindestens 1 Tag bei - 80°C . Im Anschluss daran wurden die Zellen in die Flüssigstickstofftruhe überführt, wo sie bis zum Auftauen verblieben.

4.2.2.4 Auftauen von Zellen

Pro aufzutauendem Einfrierröhrchen wurden 20 ml 37°C warmes Kompletmedium in einer Zellkulturflasche mit 75 cm² Wachstumsfläche vorgelegt. Das der Flüssigstickstofftruhe entnommene Einfrierröhrchen mit den Zellen wurde zügig im

37°C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension sofort in das vorgelegte Medium gegeben. Die so befüllte Zellkulturflasche wurde in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um die Zellen von DMSO, das sich im Einfriermedium befand, zu befreien. Die weitere Kultivierung erfolgte dann wie oben beschrieben.

4.2.3 Spezifische Reduktion der Expression von GPR40

4.2.3.1 Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi)

Mit der erst kürzlich etablierten Methode der RNAi, der ein natürlicher Abwehrprozess zugrunde liegt, ist es möglich, spezifisch die Expression einzelner Gene auszuschalten bzw. zu reduzieren (Elbashir et al. 2001, Hammond et al. 2001, Zamore et al. 2000, Fire et al. 1998). Bei der RNAi-Technik wird eine kurze, doppelsträngige sog. small interfering RNA (siRNA) in die Zelle eingeschleust. Diese 21 Nukleotide lange siRNA führt zum Abbau ihrer komplementären mRNA. Der Abbau der komplementären mRNA ist transient und hat zur Folge, dass die Translation des Zielproteins für eine gewisse Zeit unterbunden wird (Elbashir et al. 2001). Die gezielte Gen-Inaktivierung zwecks Genfunktionsanalyse kann -wie in der vorliegenden Arbeit erfolgt- u.a. durch die Transfektion zielspezifischer, synthetischer siRNA erreicht werden.

4.2.3.2 Methode zur Transfektion von siRNA in Säugerzellen: Lipofektion

Für die Transfektion von siRNA in INS-1 Zellen wurde die Methode der Lipofektion benutzt. Bei dieser von Felgner et al. 1987 erstmals beschriebenen Methode wurden durch Ultraschallbehandlung einer z. T. aus kationischen Lipiden bestehenden Liposomensuspension kleine Vesikel hergestellt. Diese sind kommerziell erhältlich. Die RNA (auch möglich mit DNA) wird ionisch an die Oberfläche der Liposomen gebunden. Die Nukleinsäure-Liposomen-Komplexe fusionieren mit der Zellmembran, und werden auf bisher ungeklärte Weise in die Zelle aufgenommen (Teifel 2007).

4.2.3.2.1 Etablierung des Protokolls für die Transfektion von siRNA in INS-1 Zellen

Als fixer Startpunkt wurde die vom Hersteller der siRNA angegebene Empfehlung einer finalen siRNA-Konzentration von 100 nM verwendet (Dharmacon 2004). Es wurden zwei verschiedene Transfektionsreagenzien getestet: *RNAiFect* und *Lipofectamine 2000*, wobei sich beim Vorgehen jeweils an den Empfehlungen der Hersteller orientiert wurde (QIAGEN 2003, Invitrogen 2002). Da die Zellen auf Deckgläschen ausgesät wurden, von denen sich jedes in einer 35 mm-Kulturschale befand, mussten die Herstellerangaben auf dieses Format extrapoliert werden. Die Transfektionen wurden dann dementsprechend und mit den in Tabelle 6 aufgelisteten variablen Bedingungen durchgeführt. Die quantitative Genexpressionsanalyse zur Überprüfung der GPR40 mRNA-Herabregulation wurde an den Zeitpunkten 24 h, 48 h bzw. 72 h nach der Transfektion wie unter 4.2.8 beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

4.2.3.2.2 Etabliertes Protokoll für die Transfektion von siRNA in INS-1 Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden je 3×10^5 INS-1 Zellen/35 mm-Schale ausgesät. Jede Schale enthielt für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ ein Deckgläschen, auf dem die Zellen anwachsen. Am Folgetag wurden pro 35 mm-Schale je 12 μ l der 20 μ M siRNA (GPR40 oder NC siRNA, siehe Tab. 2) zu 200 μ l vorgewärmtem Opti-MEM I serumreduziertes Medium (37°C) pipettiert und in einem zweiten Gefäß 4 μ l *Lipofectamine 2000* zu 200 μ l vorgewärmtem Opti-MEM I (37°C). Nach vorsichtigem Mischen folgte eine 5 minütige Inkubation beider Ansätze bei RT. Anschließend wurden beide Mixe miteinander vereinigt, vorsichtig vermischt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Vollmedium der Zellen gegen je 2 ml Opti-MEM I/35 mm-Schale ausgetauscht. Nach Ende der Inkubationszeit wurden je 400 μ l des siRNA-*Lipofectamine 2000*-Komplexes tropfenweise in jede 35 mm-Schale pipettiert, durch vorsichtiges Schwenken nochmals gut vermengt und die Zellen in den Brutschrank gegeben. Die Endkonzentration der siRNA betrug in jedem well 100 nM. Nach 5 Stunden wurde

das Transfektionsmedium gegen normales Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen verblieben bis zu ihrer weiteren Verwendung im Brutschrank. 3 Tage nach der Transfektion wurde die mRNA-Expression des Ziel-(GPR40) und des Kontrollgens (GAPDH) mittels Real-Time-PCR mit Hilfe Gen-spezifischer Primer und TaqMan-Probes und vorgeschalteter-RT-PCR bestimmt. Am Tag 4 bzw. 5 nach der Transfektion wurden die $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen und die Insulinsekretionsexperimente durchgeführt.

4.2.4 Heterologe Expression von humanem GPR40 (hGPR40) in HEK-293 Zellen

4.2.4.1 Etablierung des Protokolls für die Transfektion von hGPR40-Rezeptor in HEK-293 Zellen

Zur Transfektion wurde auch hier die Methode der Lipofektion eingesetzt. Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, von denen sich jedes in einer 35 mm-Kulturschale befand. Am Folgetag wurden die Zellen bei Variation der in Tab. 7 aufgeführten Parameter mit grünfluoreszierenden Protein (GFP) als Reportersystem (Tab. 3 und Anhang 8.1) transfiziert, wobei das Vorgehen bei der Transfektion jeweils den Empfehlungen der Hersteller der entsprechenden Transfektionsreagenzien (Invitrogen 2004, Roche 2000) entsprach. 24 h bzw. 48 h nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz (siehe 4.2.4.2) in Abhängigkeit von den Transfektionsbedingungen bestimmt.

4.2.4.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die quantitative Bestimmung der Transfektionseffizienz (Prozentsatz transfizierter Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen) erfolgte nach Transfektion der HEK-293 Zellen mit GFP als Reportersystem im mikroskopischen Bild. Hierfür waren die Zellen mit einem GFP enthaltenden Expressionsplasmid transfiziert worden (siehe Tab. 3). 24 h bzw. 48 h nach der Transfektion wurden die HEK-293 Zellen im Mikroskop betrachtet und derselbe Bildausschnitt einmal bei Durchlicht und einmal im Fluoreszenz-Modus fotografiert (siehe Abb. 13). Zur Bestimmung

der Transfektionseffizienz wurden dann die sichtbaren Zellen in den selben 10 zufällig ausgewählten Ausschnitten beider Bilder ausgezählt. Die Transfektionseffizienz ließ sich dann wie folgt berechnen:

$$\text{Transfektionseffizienz: } \frac{\sum \text{transfizierte Zellen in den 10 Ausschnitten}}{\sum \text{Gesamtzahl Zellen in den 10 Ausschnitten}} \times 100\%$$

4.2.4.3 Etabliertes Protokoll für die Transfektion von hGPR40-Rezeptor in HEK-293 Zellen

Der geklonte hGPR40-Rezeptor, der sich in dem Expressionsplasmid pCDN (siehe Tab. 3) befand, wurde freundlicherweise von Dr. Celia Briscoe von GlaxoSmithKline, U.S.A., zur Verfügung gestellt. Einen Tag vor der Transfektion wurden je 4×10^5 HEK-293 Zellen auf ein Deckgläschen, das sich in einer 35 mm-Kulturschale befand, ausgesät. Am Folgetag wurden pro Deckgläschen vorsichtig und ohne die Gefäßwand des Eppendorfgefäßes dabei zu berühren 3 μl des auf RT gebrachten Transfektionsreagenzes Fugene 6 in 97 μl des vorgewärmten (37°C) Transfektionsmediums Opti-MEM I pipettiert. Anschließend wurde 1 μg der jeweiligen Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde dieser Ansatz 30 min. bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurde das alte Kulturmedium gegen je 2 ml frisches Kulturmedium ausgetauscht. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen pipettiert, durch vorsichtiges Schwenken gut verteilt und die Zellen in den Brutschrank gegeben. Am 2. Tag nach der Transfektion wurden die Zellen zu Messzwecken eingesetzt.

4.2.5 Herstellung der Fettsäure-Stimulationslösungen

Die fertigen Stammlösungen der Fettsäuren (siehe 4.1.11) einschließlich 2-Bromopalmitat wurden dem zunächst noch CaCl_2 -freien, auf 37°C temperierten Ca^{2+} -Messpuffer (120 mM NaCl, 20 mM HEPES, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 5 bzw. 10 mM Glukose, 0.1 % [w/v] Fettsäure-freies BSA, 15 Min. mit 100 % O_2 begast, pH 7,4) tropfenweise unter kräftigem Rühren zugegeben

und ca. für 1 h bei 37°C stehen gelassen, damit sich die Fettsäure an das BSA binden konnte. Da Ca^{2+} schwerlösliche Salze mit Fettsäuren bildet, wurde CaCl_2 erst direkt vor Messbeginn aus einer 1 M Stammlösung hinzugefügt. Die Endkonzentration der meisten Fettsäure-Stimulationslösungen, außer wenn anders angegeben, lag bei 100 μM . Die Endkonzentration des fettsäurefreien BSA wurde stets bei 16.6 μM (1 mg/ml) gehalten, so dass das $\text{FFS}_{\text{total}}/\text{Albumin}$ -Verhältnis der 100 μM Fettsäure-Stimulationslösungen, die miteinander verglichen wurden, konstant bei 6, das der 200 μM Fettsäure-Lösungen bei 12, der 300 μM Fettsäure-Lösungen bei 18 usw. lag (Richieri et al. 1993). Spector et al. 1971 und Richieri et al. 1993 bieten verschiedene Ansätze an, um die absoluten Konzentrationen an ungebundenen Fettsäuren in Abhängigkeit der Serumalbuminkonzentration der Lösungen zu berechnen.

4.2.6 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in Einzelzellen

4.2.6.1 Prinzip der Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit Fura-2

Zur Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Einzelzellen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 verwendet. Fura-2 ist ein Ca^{2+} -Chelator und bindet Ca^{2+} mit einer K_d von 224 nM (Grynkiewicz et al. 1985). Bei Ca^{2+} -Bindung verändert Fura-2 sein Fluoreszenzverhalten. Bei gleichbleibendem Emissionsmaximum (510 nm) verschiebt sich das Anregungsmaximum der Substanz mit der Bindung eines Ca^{2+} -Ions von 380 nm nach 340 nm. Belädt man eine Zelle mit Fura-2, so ist ihre Fluoreszenz bei 510 nm also von der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ abhängig: nach Exzitation bei 340 nm ist die Fluoreszenz umso intensiver, je höher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist; nach Exzitation bei 380 nm ist sie umso schwächer, je höher $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Messung erfolgt dementsprechend im „dual-wavelength-Verfahren“, d.h. der Farbstoff wird abwechselnd bei 340 nm und 380 nm angeregt. Aus der bei 510 nm gemessenen Fluoreszenzintensität nach Anregung bei 340 nm bzw. 380 nm wird dann ein Quotient, die sog. Ratio (R), berechnet. $R = F_{\text{Ex. 340}}/F_{\text{Ex. 380}}$ (F = Fluoreszenz-Intensität nach Exzitation). Die Quotientenbildung macht den Wert unabhängig von der Fura-2-Konzentration und der Zelldicke. Aus der Ratio lässt sich bei einem

entsprechend kalibrierten System unmittelbar die absolute intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration berechnen. Da Fura-2 nicht membrangängig ist, wurde der Fluoreszenzfarbstoff in Form des membrangängigen Acetomethylesters (AM) verwendet. Fura-2 AM wird in die Zelle aufgenommen und reichert sich dort nach Esterhydrolyse an.

4.2.6.2 Vorbereitung der Zellen für die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit Fura-2

In Vorbereitung auf die Messung wurden die Zellen, die auf runden Deckgläschen subkultiviert worden waren, zunächst vom Nährmedium befreit, das durch Ca^{2+} -Messpuffer (120 mM NaCl, 20 mM HEPES, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.5 mM CaCl_2 , 5 bzw. 10 mM Glukose, 0.1% [w/v] Fettsäure-freies BSA, 15 Min. mit 100% O_2 begast, pH 7,4) ersetzt wurde. Für Ca^{2+} -freie extrazelluläre Bedingungen wurde das CaCl_2 des Puffers durch EGTA (2.5 mM) ersetzt. Der einzige Unterschied bei der Behandlung der verschiedenen Zellarten lag in der Glukosekonzentration des verwendeten Puffers. Während für die HEK-293 Zellen Puffer mit 10 mM Glukose verwendet wurde, wurden die beiden β -Zellarten (primäre und INS-1) in 5 mM Glukose gehalten, um Glukose-induzierte Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu vermeiden. Die Zellen wurden zunächst 30 Min. bei 37°C an den Ca^{2+} -Messpuffer gewöhnt und anschließend mit dem Beladungspuffer (wie oben, zusätzlich 0.5% [w/v] BSA, 0.025% [w/v] Pluronsäure und 2.5 μM Fura-2 AM) für weitere 30 Min. bei 37°C inkubiert. Pluronsäure (Pluronic F-127) ist ein Detergens, das es dem schlecht wasserlöslichen Farbstoff-Acetomethylester ermöglicht, sich im Puffer zu verteilen. Anschließend wurde der Beladungspuffer abgesaugt und die Zellen zweimal mit Ca^{2+} -Messpuffer gewaschen, um verbliebene Farbstoffreste zu entfernen und schließlich mit 2 ml Ca^{2+} -Messpuffer versehen. So konnten die Zellen unter lichtgeschützten Bedingungen bei RT maximal 2 Stunden ohne Qualitätseinbußen für Messzwecke aufbewahrt werden.

4.2.6.3 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit dem Photomultiplier

Die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit dem Photomultiplier ermöglicht es, die $[Ca^{2+}]_i$ einer einzelnen Zelle zu messen. Das ist bei den aus der Maus isolierten primären Zellen von Vorteil, da die Deckgläschen der Zellpräparation alle 4 Inselzelltypen enthalten und so durch Selektion die isolierte Messung der β -Zellen möglich wird. Darum kam diese Messmethode hauptsächlich bei primären β -Zellen zum Einsatz, aber auch bei den Vorversuchen mit den INS-1 Zellen.

Die Deckgläschen mit den Zellen wurden in eine temperierte Perfusionskammer (37°C) eingesetzt, so dass das Deckgläschen den Boden der Kammer bildete, und in eine passende Halterung auf dem Kreuztisch eines Fluoreszenz-Mikroskops (Axiovert IM 135, Zeiss) eingesetzt. Die Kammer wurde während des gesamten Messvorgangs mit dem reinen Ca^{2+} -Messpuffer bzw. mit dem Ca^{2+} -Messpuffer, der das entsprechende Stimulans enthielt, perfundiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0.8 ml/Min, das Kammervolumen 1 ml. Die Ca^{2+} -Messungen wurden an Zellen von durchschnittlicher Größe und vitalem Aussehen (glatte Membranstrukturen) durchgeführt. Bei den primären Zellen war dem geschulten Auge die sichere Auswahl der β -Zellen aufgrund der Zellmorphologie (charakteristische Form) möglich. Zu Beginn der Experimente erfolgte die Identifikation der β -Zellen mittels Stimulation mit Glukose (10 mM). Nur Zellen, bei denen dem Glukose-stimulierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ein typischer Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ vorausging, wurden als β -Zellen betrachtet.

Die Messungen wurden mit dem Komplettsystem *Deltascan 4000* der Firma Photon Technology International (PTI) durchgeführt, das wie folgt funktionierte: Das Anregungslicht für den Fluoreszenzfarbstoff lieferte eine Xenon-Bogenlampe. Mittels einer rotierenden Scheibe (Chopper) wurde das Licht alternierend auf die Eintrittsspalten eines Paares von Monochromatoren abgebildet, die das Licht in seine spektralen Anteile zerlegten. Rechnergesteuert trat dann das Licht definierter Wellenlänge (340 und 380 nm) an den Austrittsspalten wieder aus, wo es von einem Quarzlichtleiter in den Epifluoreszenzeingang des Mikroskops und von hier aus durch ein UV-durchlässiges Objektiv zum Präparat weitergeleitet wurde. Das vom Präparat emittierte Fluoreszenzlicht wurde über das Objektiv

aufgefangen und durch einen Sperrfilter vom Anregungslicht getrennt, so dass ausschließlich Licht im Wellenlängenbereich von 510-540 nm zum Photometer gelangen konnte. Das Photometer bestand aus einem Lichtdetektor sowie optischen Hilfsmitteln zur Einstellung des Messfeldes. Durch vier verstellbare Blenden konnten Form und Größe des Messfeldes rechteckig um die ausgewählte Zelle herum angepasst und festgelegt werden, so dass sich störende Einflüsse aus der Umgebung ausschalten ließen und sich nur noch die einzelne Zelle im Lichtweg befand. Ein Kippspiegel gab alternativ den Weg auf den Lichtdetektor oder Betrachtermodus frei. Als Lichtdetektor diente ein Photomultiplier. Das in Form von Photonen auf den Photomultiplier auftreffende Signal wurde in Spannung konvertiert, amplifiziert und von einem Computer mit spezieller Software (Felix, PTI) aufgenommen und verarbeitet. Aus der jeweils gemessenen Ratio R (siehe Prinzip der Messung) konnte von der Software aufgrund erfolgter Kalibration des Systems unmittelbar die absolute $[Ca^{2+}]_i$ berechnet und aufgezeichnet werden und war als Funktion der Zeit auf dem Computerbildschirm zu sehen. Die Kalibration und die Berechnung der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgten nach Grynkiewicz et al. 1985. Die gewonnenen Daten wurden zwecks Auswertung in das Programm *Microsoft Excel* exportiert.

4.2.6.4 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit digitalem Video-Imaging

Das digitale Video-Imaging bietet gegenüber der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit dem Photomultiplier den Vorteil, dass parallel die $[Ca^{2+}]_i$ mehrerer Zellen und sogar die ganzer Zellverbände beobachtet und aufgezeichnet werden können. Das wurde bei mit siRNA transfizierten INS-1 Zellen und den dazugehörigen Kontrollmessungen sowie allen HEK-293-Messungen ausgenutzt.

Zur Messung wurden die Deckgläschen mit den Zellen in die Messkammer eines invertierten Mikroskops (Axiovert 100, Zeiss) eingespannt und mit 1 ml Ca^{2+} -Messpuffer überschichtet. Kurz oberhalb des Kammerspiegels war eine Absaugapparatur montiert. Die Zugabe der Stimulanzen erfolgte durch vorsichtiges Zupipettieren von 4 ml der jeweiligen Lösung in Endkonzentration während der Messung. Durch die Absaugvorrichtung konnte die Flüssigkeit in der Kammer auf diese Weise rasch ausgetauscht werden. Benutzt wurden weiterhin

ein Monochromator (Polychrome IV, TILL-Photonics) mit einer Xenon-Hochdrucklampe und eine gekühlte CCD-Kamera (IMAGO, TILL-Photonics). Die Messungen wurden mit einem Fluar 10x/0,5-Objektiv durchgeführt. Die Fluoreszenz von Fura-2 wurde über einen 505 nm-Farbteiler alternierend bei 340 und 380 nm angeregt. Das Emissionslicht wurde über einen nachgeschalteten 510 nm-Langpassfilter zur Kamera geleitet (Farbteiler und Filter von Chroma Technology). Ein schwenkbarer Spiegel erlaubte wahlweise die Betrachtung der Probe im Okular oder die Anfertigung von Aufnahmen durch die Kamera. Die einzelnen Komponenten des Systems konnten zentral durch einen Computer mit einer geeigneten Software (TILL Vision, TILL Photonics) gesteuert werden. Die Analyse der Bilddaten erfolgte im Anschluss an das jeweilige Experiment. Dazu wurden in den entstandenen Bildsequenzen sogenannte *regions of interest* (ROIs) definiert, über denen die Pixelintensitäten von der Software gemittelt und im Zeitverlauf dargestellt wurden. Zur Bestimmung des Hintergrundsignals wurden am Ende jeder Messung alle Zellen vom Deckgläschen abgespült und die verbleibende Fluoreszenz in jeder ROI als Hintergrundfluoreszenz für die jeweilige Region verwendet, wobei das Deckgläschen relativ zum Objektiv nicht verschoben wurde. Die weitere Analyse der so gewonnenen Daten erfolgte in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft). Kalibration und Berechnung der $[Ca^{2+}]_i$ aus den aufgezeichneten Fluoreszenzen erfolgten mit einer eigens für dieses Messsystem entwickelten Software (Michael Schaefer, Berlin) nach dem von Lenz et al. 2002 beschriebenen Verfahren.

4.2.7 Stimulation und Messung der Insulinsekretion

4.2.7.1 Stimulation der Insulinsekretion

Die INS-1 Zellen wurden wie unter 4.2.3.2.2 beschrieben in 6-Well-Platten ausgesät und mit siRNA transfiziert. Am 4. Tag nach der Transfektion bzw. am 5. Tag nach der Aussaat (untransfizierte Zellen) wurden die Zellen mit Ca^{2+} -Messpuffer (vgl. 4.2.6.2) gewaschen und für 1 Stunde bei 37° im CO_2 -freien Brutschrank vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zwei Mal mit Ca^{2+} -Messpuffer gewaschen, um dann mit dem die entsprechenden Stimulanzen

enthaltenden Ca^{2+} -Messpuffer (1 ml/well) versehen zu werden. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37° im CO_2 -freien Brutschrank wurde der Überstand vollständig von den Zellen abpipettiert, durch Zentrifugation von restlichen Zelltrümmern gereinigt und bis zur Messung der Insulinkonzentration bei -20°C gelagert (Protokoll in Anlehnung an Asfari et al. 1992).

4.2.7.2 Messung der Insulinsekretion

Zur quantitativen Bestimmung der sezernierten Insulinkonzentration im Puffer wurde das *Rat Insulin ELISA Kit* der Firma Crystal Chem Inc. verwendet. Dabei handelt es sich um einen sog. *Sandwich-ELISA*. Das Insulin der Probe bindet hierbei an einen an eine Mikrotiterplatte gebundenen gegen Insulin gerichteten Antikörper, der als „Fang“-Antikörper fungiert und das Insulin der Probe immobilisiert. Nun wird ein sog. Primär-Antikörper eingesetzt, der gegen ein anderes Epitop des bereits angelagerten Insulins gerichtet ist. Dann werden unspezifisch adsorbierende Bereiche an der Oberfläche der Mikrotiterplatte durch entsprechende Behandlung blockiert. Sodann wird mit einem Sekundär-Antikörper, der gegen den Primär-Antikörper gerichtet ist und an ein Enzym (Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist, das die Bildung eines gefärbten Reaktionsprodukts katalysiert, inkubiert. Mit der Zugabe des Substrats - o-Phenyldiamin + H_2O_2 in Puffer für Peroxidase - wird die als Messgröße dienende Bildung von Farbstoff eingeleitet. Dessen Extinktion wird bei 492 nm im ELISA-Photometer (z.B. Victor 1420 Multilabel Counter, Wallac) gemessen. Die Intensität der Färbung ist ein Maß für die Konzentration des Insulins in der Probe, die über einen mitgeführten Standard quantifiziert werden kann. Die Durchführung erfolgte nach 1:200-Vorverdünnung der Proben mit dem im Kit enthaltenen Diluent 1 exakt nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll 1 (Crystal Chem Inc. 2004), das für Nicht-Serum- bzw. Nicht-Plasmaproben formuliert wurde.

4.2.8 Quantitative Genexpressionsanalyse

4.2.8.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Zur Isolierung der RNA aus INS-1 Zellen wurde das *RNeasy Minikit* mit Homogenisierungssäulen (QIAshredder) der Firma QIAGEN verwendet. Das Prinzip des Kits beruht auf der Zellyse mit anschließender Homogenisierung des Zellmaterials, Adsorption der Gesamt-RNA an eine Silicagelmembran einer speziellen Isolierungssäule sowie Auswaschen und somit Abtrennen der übrigen Substanzen und schließlich der Elution der RNA mit RNase-freiem Wasser. Die Durchführung erfolgte bis zum Schritt der RNA-Elution exakt nach dem Spin-Protokoll des Herstellers, bei dem alle Bindungs-, Wasch- und Elutionsschritte durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge ausgeführt wurden (QIAGEN 2002). Zur Elution wurde die trockene Säule auf ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und die RNA durch zweimaliges Aufpipettieren von je 15 µl RNase-freiem Wasser auf die Säule ausgewaschen. Danach wurde je 5 min. bei RT inkubiert und 1 min bei $\geq 8000 \times g$ zentrifugiert.

4.2.8.2 DNase-Verdau der isolierten Gesamt-RNA

Für RNA-Applikationen wie die TaqMan-PCR-Analyse, die empfindlich gegenüber kleinsten Kontaminationen an DNA sind, empfiehlt der Hersteller des RNeasy Minikits eine zusätzliche Entfernung letzter möglicher DNA-Kontaminationen. Aus diesem Grund wurde im Anschluss an die Isolierung der RNA ein DNase-Verdau angeschlossen, der mit dem *DNA-free Kit* der Firma Ambion durchgeführt wurde. Hierzu wurden dem zuvor eluierten 30 µl-RNA-Ansatz 3 µl 10x *DNase I-Puffer* und 1 µl DNase I zugesetzt und bei 37°C für 25 min. im Heizblock inkubiert. Abschließend wurden dem Ansatz 3 µl *DNase Inactivation Reagent* zugesetzt, nach gutem Mischen für 2 min. bei RT inkubiert, dann 1,5 min. bei 10.000 x g zentrifugiert und die RNA sofort in ein neues Eppendorfgefäß, das auf Eis gelagert wurde, überführt.

4.2.8.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsmessung von RNA bzw. DNA erfolgte im UV-Spektrometer bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Die optische Dichte (OD) von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml RNA bzw. einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Unter Berücksichtigung einer eventuellen Verdünnung wurde die Konzentration der isolierten RNA wie folgt berechnet:

$$OD_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000 = \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$$

$$OD_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000 = \mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$$

Zur Bestimmung der Reinheit wurde außerdem die OD bei 280 nm gemessen. Dort liegt das Absorptionsmaximum aromatischer Verbindungen (z.B. aromatische Aminosäuren, Phenol). Über den Quotienten der OD von bei 260 nm und 280 nm ($OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$) lässt sich eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung machen. Optimal ist ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0, während kleinere Werte auf die Anwesenheit von Proteinen hinweisen. Werte über 2,0 zeigen Salz- oder Nukleotidverunreinigungen an, die z.B. aufgrund eines Abbaus von RNA durch RNAsen entstanden sind (Schrimpf 2002).

4.2.8.4 Qualitätskontrolle einer RNA-Präparation

Die Intaktheit einer Gesamt-RNA-Präparation kann durch eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese ermittelt werden. Zwei scharfe und deutlich zu sehende Banden für die 28 S und die 18 S rRNA, deren Fluoreszenzintensitäts-Verhältnis etwa 2:1 betragen sollte, zeigen im gefärbten Gel eine intakte Präparation an. Verwendet wurde ein Formaldehyd-Agarose(FA)gel. Die denaturierende Wirkung des Formaldehyds kommt dadurch zustande, dass die Aldehydgruppe mit den Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin Schiff'sche Basen bildet, die dadurch nicht mehr zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Verfügung stehen. Hierdurch wird die Formation von

Sekundärstrukturen und Aggregaten verhindert. Da Formaldehyd auch mit anderen Aminogruppen reagiert, die z.B. im Tris-Puffer vorkommen, wird für Formaldehydgele ein Gemisch aus MOPS, Natriumacetat und EDTA als FA-Gelpuffer verwendet. Die RNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel im RNA-Ladepuffer denaturiert, der neben Formaldehyd u.a. auch Formamid enthält, das die Basenpaarung der RNA zerstört und so eine Reaktion der Basen mit dem Formaldehyd ermöglicht (Schrimpf 2002). Für das Gel (1,2 % Agarose) wurden 1,2 g Agarose mit 10 ml 10x FA-Gelpuffer gemischt und mit DEPC-H₂O auf 100 ml aufgefüllt. Das Gemisch wurde in einer Mikrowelle erhitzt und anschließend auf ca. 60°C abgekühlt. Danach wurden 1,8 ml 37%iges (12,3 M) Formaldehyd und 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde das Gel in die Gelkammer gegossen, ausgehärtet und für ca. 30 min. in 1x FA-Gel-Laufpuffer äquilibriert. Jede Probe setzte sich aus 5 µg RNA, der 4 Volumina entsprachen, und 1 Volumen 5x RNA-Ladepuffer zusammen. Nach dem Mischen wurden die Proben 15 min. bei 65°C erhitzt, 2 min. auf Eis gestellt und auf das äquilibrierte Gel aufgetragen. Die Elektrophorese fand mit dem 1x FA-Gel-Laufpuffer bei 70 V statt. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid, das in die RNA interkaliert, wurde diese angefärbt und konnte anschließend durch UV-Licht (302 nm) in einem Geldokumentationsgerät sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Verwendete Puffer und Lösungen:

10x FA-Gelpuffer

MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM

pH mit NaOH auf 7,0 einstellen.

1 x FA-Gel-Laufpuffer

10x FA-Gelpuffer	100 ml
37 % (12,3 M) Formaldehyd	20 ml

DEPC-H₂O 880 ml

DEPC-H₂O

0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat in dest. H₂O, durch kräftiges Schütteln lösen, über Nacht bei 37° inkubieren lassen, anschließend autoklavieren.

5 x RNA-Ladepuffer

gesättigte wässrige Bromphenolblau-Lösung	16 µl
500 mM EDTA (pH 8,0)	80 µl
37 % (12,3 M) Formaldehyd	720 µl
100 % Glycerol	2 ml
Formamid	3,084 ml
10x FA-Gelpuffer	4 ml

Mit DEPC-H₂O auf 10 ml auffüllen (ca. 3 Monate bei 2-8°C haltbar).

4.2.8.5 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Die mRNA musste zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, da RNA zwecks Genexpressionsanalyse nicht direkt als *Template* in der TaqMan-PCR eingesetzt werden kann, weil sie keine geeignete Matrize für die Polymerase darstellt. Die Umschreibung erfolgte durch eine Reverse Transkriptase. Das ist eine aus Viren stammende DNA-Polymerase, deren Fähigkeit ausgenutzt wurde, einzelsträngige mRNA als Matrize zu verwenden, um von dieser eine DNA-Kopie zu erstellen. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe der *SuperScript II Reverse Transcriptase* samt dazugehörigem Puffer der Firma Invitrogen. Von der intakten Gesamt-RNA wurde 1 µg einer jeden Probe in einer Gesamtmenge von 11 µl DEPC-H₂O aufgenommen und mit 1 µl (0,5 µg) Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer, der an den Poly-A-Schwanz von mRNA bindet, in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Der Ansatz wurde in den Thermocycler gegeben und für 10 min. bei 70°C erhitzt. Bei diesem Vorgang brachen die Sekundärstrukturen der RNA auf. Im folgenden kühlte das Programm auf 4°C herunter. Zwischenzeitlich wurde ein Mastermix pipettiert, der pro Ansatz aus 4 µl 5-fach

First-Strand Puffer, 2 µl 0.1 M Dithiothreitol (DTT) und 1 µl 10 mM dNTP-Mix bestand. War der Cycler auf 4°C heruntergekühlt, wurden die 7 µl Mastermix dem obigen Ansatz zügig hinzugegeben und im Cycler 2 Min. bei 42°C inkubiert. Hierbei hybridisierten die Primer. Im Anschluss daran wurde vorsichtig 1 µl *SuperScript II Reverse Transcriptase* zupipettiert und dann 50 Min. auf 42°C inkubiert (Arbeitsoptimum der Reversen Transkriptase). Anschließend wurde die Reaktion durch 15 minütiges Erhitzen bei 70°C inaktiviert und abschließend auf 4°C heruntergekühlt. 1 µl der so entstandenen cDNA wurde sofort als *Template* für die TaqMan-PCR eingesetzt oder der Ansatz bis zu seiner Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.8.6 Quantitative Real-Time-PCR

Die Quantifizierung einer spezifischen mRNA ist mit Hilfe der Real-Time-PCR möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die sogenannte TaqMan-PCR durchgeführt, bei der zusätzlich zu den beiden Primern, die in jeder PCR vorhanden sind, ein weiteres Oligonukleotid, die sog. TaqMan-Probe, verwendet wird. Dieses Oligonukleotid bindet an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern und ist mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung kann der Fortgang der PCR-Reaktion in Echtzeit („Real-time“) verfolgt werden. Solange die beiden Fluoreszenzfarbstoffe, wie es in der intakten TaqMan-Probe der Fall ist, sich nahe beieinander befinden, wird nach Anregung durch einen Argonlaser die Energie des einen Farbstoffes, dem sog. Reporterfarbstoff (hier: FAM) auf den anderen Farbstoff, den sog. Quencherfarbstoff (hier: TAMRA) übertragen und nur dieser emittiert Licht (Fluoreszenz-Energietransfer). Während der PCR werden die Primer mittels der Taq-Polymerase verlängert, wobei diese irgendwann auf die TaqMan-Probe trifft. Aufgrund der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase wird die TaqMan-Probe dann abgebaut, weshalb die beiden Fluoreszenzfarbstoffe nicht mehr nah genug beieinander sind, um den oben beschriebene Energietransfer zu ermöglichen. Nun können beide Farbstoffe Licht emittieren. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Reporterfluoreszenz also mit jedem PCR-Zyklus an (Holland et al. 1991, Lee et al. 1993). Die Veränderung der

Fluoreszenz wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors in jedem Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst und über einen PC aufgezeichnet. Während die Reporterfluoreszenz bei einer größeren Ausgangsmenge der untersuchten Nukleinsäure bereits früher (bei kleineren PCR-Zykluszahlen) zu detektieren ist, ist sie bei einer geringen Ausgangsmenge der untersuchten Nukleinsäure erst später (bei höheren Zykluszahlen) zu messen.

Für die Durchführung wurde der *Brilliant QPCR Master Mix* von Stratagene verwendet: Das Reaktionsvolumen pro Ansatz entsprach der Hälfte der Herstellerangabe (Stratagene 2004) und betrug 25 µl. Jeder Ansatz setzte sich zusammen aus:

8,1 µl Nuklease-freiem Wasser

12,9 µl 2x *Brilliant QPCR Master Mix* inkl. *Reference Dye*

2,5 µl 2 pmol TaqMan Probe Rat GPR40/GAPDH (siehe Tab. 1)

0,25 µl 50 pmol TaqMan Primer forward Rat GPR40/GAPDH (siehe Tab. 1)

0,25 µl 50 pmol TaqMan Primer reverse Rat GPR40/GAPDH (siehe Tab. 1)

1 µl cDNA.

Die Ansätze wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die PCR-Reaktion und die anschließende Auswertung erfolgten im *ABI PRISM 7700 Sequence Detection System*. Das Gerät verfügt über einen eingebauten Thermocycler, in dem die Proben nach 10 minütiger Denaturierung bei 95°C 40 mal folgenden Zyklus durchliefen: 15 s 95°C, 1 Min. 60°C.

4.2.8.7 Berechnung der Genexpression

Die Auswertung der TaqMan-Ergebnisse erfolgte mittels relativer Quantifizierung. Dabei wird nicht die absolute Startkopienzahl oder -konzentration bestimmt sondern die Genexpression eines Zielgens auf ein zweites, nicht reguliertes ubiquitär und homogen exprimiertes Referenzgen (*Housekeeping Gen*) bezogen. Das wird auch als Normalisierung der Expressionsergebnisse bezeichnet (Pfaffl 2004). In dieser Arbeit wurde GAPDH zur Normalisierung herangezogen. Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge wurde der sog. C_T -Wert (*Threshold Cycle*)

ermittelt. Dieser Wert entspricht der Zyklenzahl, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporterfluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird.

Am C_T -Wert befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Im Falle einer 100%igen Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Daraus ergibt sich, dass ein um eine Einheit geringerer C_T -Wert der doppelten Menge an eingesetzter cDNA bzw. mRNA Startmenge entspricht. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens (GPR40) in den behandelten Zellen (mit GPR40 spezifischer siRNA behandelte INS-1 Zellen) wurde auf ein Kontrollprobenmaterial (mit Negativkontroll-[NC]siRNA behandelte INS-1 Zellen) bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte dann über die sog. ΔC_T -Methode. Von jeder Doppelbestimmung wurde der Mittelwert berechnet. Dann wurde für jede untersuchte Probe der C_T -Wert des Referenzgens vom C_T -Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta C_T = C_T$ Zielgen - C_T Referenzgen). Nach dieser Normalisierung wurde vom ΔC_T -Wert der experimentell behandelten Proben der ΔC_T -Wert der Kontrollproben abgezogen, was zum sog. $\Delta\Delta C_T$ -Wert führte ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ Behandlung - ΔC_T Kontrolle). Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert auf das Referenzgen, ergab sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak und Schmittgen 2001). Werte > 1 entsprechen einer stärkeren, Werte < 1 einer schwächeren Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen.

4.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird ein Standard mit DNA-Fragmenten bekannter Länge neben den Proben im Gel aufgetrennt. Er erlaubt die Längenbestimmung der Fragmente in der Probe. Zur optischen Auswertung der Banden im Gel nutzt man die Interkalation von Ethidiumbromid in DNA, welches dem Gel zugesetzt wird. Im ultravioletten Licht (254-366 nm) wird die interkalierte DNA zur Emission von sichtbarem Licht (590 nm) angeregt, was mit einer Kamera

aufgezeichnet und als Schwarzweißbild ausgegeben werden kann (Schrimpf 2002).

2,2 g Agarose wurden durch Erhitzen in der Mikrowelle in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 5 µl Ethidiumbromid (10mg/ml) versetzt. Aus dieser Lösung wurde das Gel gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde es in eine Elektrophoresekammer in 0,5 x TBE-Puffer gelegt. In die erste Tasche des Gels kam der Längenstandard. Hierfür wurden 2 µl 100 bp DNA-Ladder mit 2 µl 6x Blue/Orange-Ladepuffer und 8 µl Wasser vermischt. In die übrigen Geltaschen wurden je 10 µl des PCR-Produktes, vermischt mit 2 µl 6x Blue/Orange-Ladepuffer pipettiert. Anschließend wurden Proben und Längenstandard im elektrischen Feld aufgetrennt, um danach unter UV-Licht betrachtet und fotografiert zu werden.

10 x TBE-Puffer (pH 8,0)

Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA	5,8 g

mit destilliertem (entmineralisiertem) H₂O auf 1000 ml auffüllen.

4.2.10 Mutagenese

Bei den zu erzeugenden Mutationen handelte es sich zum einen um eine Asp175Asn Mutation, zum anderen um einen Arg211His Polymorphismus des GPR40-Rezeptors (Ogawa et al. 2005, Hamid et al. 2005, Haga et al. 2002). Um sie zu erzeugen, mussten Punktmutationen in die Nukleotidsequenz des GPR40-Wildtyp-Rezeptors eingeführt werden, die zur gewünschten Änderung der Aminosäuresequenz führten. Der humane Wildtyp-GPR40-Rezeptor, subkloniert in pCDN, wurde von Dr. Celia Briscoe von GlaxoSmithKline, U.S.A. zur Verfügung gestellt (Briscoe et al. 2003, siehe auch Tab. 3). Im Falle der Asp175Asn Mutation musste das Ursprungscodon GAC zum AAC mutiert werden und bei dem Arg211His Polymorphismus sollte das Wildtypcodon CGC zu einem CAC mutiert werden (siehe Abb. 14 und Abb. 17).

Die zielgerichtete Mutagenese erfolgte mit Hilfe des *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene, das - im Gegensatz zu den meisten anderen Mutagenesetechniken - die Mutagenese im doppelsträngigen Plasmid ermöglicht. Die dem Kit zugrunde liegende Methode basiert auf einer Amplifikation der beiden Plasmid-DNA-Einzelstränge des Wildtyp-Rezeptors mittels PCR, wobei als Startpunkt einander komplementäre Primer verwendet werden, die in ihrer Sequenz den gewünschten Nukleotidaustausch tragen. Für die Elongations-Reaktion wird dann eine DNA-Polymerase verwendet, die eine hohe Replikationsgenauigkeit besitzt. Im Anschluss an die Mutations-PCR wird nichtmutierte, methylierte DNA durch das Restriktionsenzym Dpn I verdaut. Nach dieser Selektion wird eine Transformation in ultrakompetente *E. coli* durchgeführt, wobei die Bakterien die mutierten PCR-Fragmente wieder zum zirkulären Plasmid verschließen und vermehren (Stratagene 2003).

4.2.10.1 Design der Mutageneseprimer

Das Design der Mutageneseprimer erfolgte nach den im Herstellerprotokoll (Stratagene 2003) gemachten Vorgaben und wurde mit Hilfe des Computerprogramms Oligo (Rychlik und Rhoads 1989) realisiert. Aus technischen Gründen (siehe Ergebnisteil) musste pro Primer neben der geplanten Mutation, die zur Änderung der Aminosäuresequenz führte, je eine weitere, jedoch nicht zu einer veränderten Aminosäuresequenz führende Mutation eingefügt werden („stille Mutation“). Die verwendeten Primer sind in Tab. 1 aufgelistet.

4.2.10.2 Durchführung der Mutagenese-PCR

Das vom Hersteller vorgegebene Protokoll (Stratagene 2003) wurde wie folgt modifiziert: Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 20 µl. In jeden Ansatz wurden 2 µl des im Kit enthaltenen, 10fach konzentrierten Reaktionspuffers und 1 µl des ebenfalls im Kit enthaltenen Desoxynukleotidtriphosphat-Mix (dNTPmix) gegeben. Als Template-DNA wurden 50 ng des hGPR40-wt-Plasmids eingesetzt, von den Vorwärts- und Rückwärtsprimern je 125 ng. Die Differenz zum

Endvolumen von 20 µl wurde mit autoklaviertem, zweifach destilliertem Wasser aufgefüllt. Zum Schluss wurden 0,5 µl des Enzyms *Pfu Turbo* DNA-Polymerase zugegeben. Der Ansatz wurde in den PCR-Cycler gegeben und die DNA bei 95°C für 30 s geschmolzen. Danach folgten 20 PCR-Zyklen mit folgendem Profil:

95°C für 30 s
58°C für 1 Min.
68°C für 10 Min.

Abschließend folgte eine 20 minütige Reaktion bei 68°C. Nach der PCR wurden alle Ansätze für 2 Min. auf Eis heruntergekühlt, mit je 0,5 µl *DpnI* (5 U/µl), 0,5 µl des 10fach konzentrierten Reaktionspuffers und 4,5 µl Wasser versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert.

4.2.11 Transformation der mutierten PCR-Plasmide in *E. coli*

Zur Vermehrung der mutierten PCR-Plasmide wurden diese in ultrakompetente Bakterien (*E. coli* XL-Blue, im Kit enthalten) eingeschleust. Das geschah durch „Hitzeschock“ und lief wie folgt ab: 5 µl des Mutageneseansatzes wurden zu 50 µl auf Eis stehenden, ultrakompetenten Zellen gegeben und dort nach vorsichtigem Mischen für 20 Min. inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 45 s in ein auf 42°C erwärmtes Wasserbad gehalten (Hitzeschock) und im Anschluss daran für 2 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl auf 42°C vorgewärmtem SOC-Medium (Invitrogen) wurde bei 37°C und 225 rpm für 1 h im Schüttelinkubator bebrütet. Danach wurde jeder Ansatz auf einer Ampicillin-haltigen LB-Platte (LB-Amp-Platte) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

LB-Amp-Platte

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar-Agar	1,5% (w/v)

mit NaOH auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren, nach Abkühlen unter 50°C 100 mg Ampicillin/l hinzugeben, auf Petrischalen (10 cm Durchmesser) verteilen und erstarren lassen.

4.2.12 Picken der Kolonien und Ansetzen der Übernachtskulturen

Auf jeder LB-Amp-Platte waren einige Kolonien gewachsen, von denen jede aus einer transformierten Bakterienzelle hervorging, weil das aufgenommene Plasmid resistent gegen Ampicillin ist und dadurch auf der Ampicillin-haltigen LB-Platte überleben kann. Um nun für jede Mutation einzelne Klone auf das Gelingen der Mutagenese hin untersuchen zu können, wurden jeweils fünf Einzelkolonien pro Mutation gepickt und im Selektionsmedium vermehrt. Hierfür wurde jede Kolonie unter sterilen Bedingungen in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und 16 h (über Nacht) bei 37°C und 175 rpm im Schüttelinkubator bebrütet. Am nächsten Tag folgte die DNA-Präparation im kleinen Maßstab (Miniprep).

Nach der Sequenzanalyse war zu erkennen, welche Plasmide die Mutationen enthielten. Um die entsprechende Plasmid-DNA für die weiteren Versuche in ausreichender Menge und Reinheit zu gewinnen, wurde hiervon je eine neue Übernachtskultur für eine folgende Midipräparation hergestellt. Dafür wurden 50 ml LB-Medium mit Ampicillin mit 500 µl der entsprechenden vorangegangenen Übernachtskultur angeimpft und für 16 h bei 37°C und 175 rpm im Schüttelinkubator bebrütet. Am nächsten Tag folgte die Midiprep.

Selektionsmedium:

LB-Medium mit Ampicillin

Trypton	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

mit NaOH auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren, nach Abkühlen auf unter 50°C 100 mg Ampicillin/l zugeben.

4.2.13 Präparation von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen

Die Isolation der Plasmid-DNA aus den Bakterien der Übernachtskultur für die Sequenzanalyse erfolgte im kleinen Maßstab aus 1,5 ml der oben angesetzten 5 ml Übernachtskultur mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen). Die für die

weiteren Experimente benötigten Plasmide wurden in größerem Maßstab isoliert. Hierfür wurden die 50 ml der oben angesetzten Übernachtskultur eingesetzt und mit Hilfe des *GenElute Plasmid HP Plasmid Midiprep Kit* (Sigma) isoliert. Bei beiden Kits wurden Zellen einer Übernachtskultur durch Zentrifugation geerntet, zum Aufschluss der Bakterien einer alkalischen Lyse unterzogen (Birnboim und Doly 1979), gefolgt von Adsorption der DNA an eine Silica-Gel-Membran in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration. Anschließendes Waschen beseitigte vorhandene Kontaminanten. Schließlich wurde die gebundene Plasmid-DNA eluiert. Die Durchführung erfolgte in beiden Fällen exakt nach dem vom Hersteller angegebenen Zentrifugationsprotokoll (QIAGEN 2006, Sigma 2005). Zum Eluieren wurde Wasser für Injektionszwecke (B. Braun) statt der in den Kits enthaltenen Elutionspuffer verwendet.

4.2.14 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Um die Plasmid-DNA auf die gewünschten Mutationen zu überprüfen, musste sie sequenziert werden. Die Sequenzierreaktion und die Aufreinigung der Proben erfolgten mit Hilfe des *DYEnamic ET DyeTerminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems* und wurde mit dem *MegaBACE 1000 Sequence Analyzer*, beides von der Firma Amersham Biosciences, analysiert. Das dahinter stehende Prinzip baut auf die von Sanger entwickelte Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode auf (Sanger et al. 1977). Hierbei dient die zu analysierende DNA als Matritze für die Synthese neuer DNA-Fragmente mit Hilfe einer DNA-Polymerase. Zunächst wird die DNA in eine einzelsträngige Form überführt. Dann wird sie mit dem Sequenzierprimer hybridisiert, der als Startpunkt der Synthese des zur Matritze komplementären Stranges durch eine DNA-Polymerase dient. Jeder Ansatz enthält Matritzen-DNA, Primer, DNA-Polymerase, alle vier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und zusätzlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs), wobei für jede DNA-Base ein anderer Fluoreszenzfarbstoff zur Verfügung steht. Da den ddNTPs die für die Knüpfung der 5'-3'-Phosphodiesterbindung erforderliche 3'-OH-Gruppe fehlt, unterbleibt nach dem Einbau folglich die Anheftung des nächsten

Nukleotidbausteins, und das Wachstum des Komplementärstranges wird unterbrochen. So entsteht ein Gemisch unterschiedlich langer Teilstücke mit einem gemeinsamen Primer-bedingten 5'-Ende, während das 3'-Ende durch eines der vier fluoreszenzmarkierten ddNTPs gebildet wird. Die entstandenen Kettenabbruchprodukte werden dann im *MegaBACE 1000 Sequence Analyzer* elektrophoretisch in feinen Kapillaren, die eine Polyacrylamid-Matrix enthalten, aufgetrennt. Zum Beladen des Systems wird lediglich eine 96-well Mikrotiterplatte mit den enthaltenen Proben in das Gerät gestellt. Durch das Anlegen einer Spannung gelangt mittels elektrokinetischer Injektion jede Probe in eine Kapillare, wo dann die elektrophoretische Auftrennung stattfindet. Das kleinste Fragment mit der größten Wanderungsstrecke entspricht dem ersten Nukleotid-Baustein der Sequenz, das nächstgrößere mit etwas geringerer Mobilität dem zweiten u.s.w. Auf diese Weise wird die komplette, lückenlose Nukleotid-Abfolge der DNA erhalten. Die Farbstoffe werden beim Durchlaufen mittels eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt und können anhand ihrer jeweilig unterschiedlichen Emissionsstrahlung sicher identifiziert werden. Diese differierenden Signale werden einzeln registriert und von einem Computer mit spezieller Software zur DNA-Sequenz zusammengefügt (Amersham Biosciences 2002). Die Dokumentation zeigt eine Folge von Peaks, die einzelnen Nukleotiden bzw. ihren Basen zugeordnet werden können (Abb. 14).

Die Sequenzieransätze wurden je wie folgt pipettiert:

Plasmid-DNA	x µl (entsprechend 500-1000 ng)
H ₂ O	x µl
Primer (5 pmol/µl)	1 µl
Sequencing Premix	8 µl
<hr/>	
Gesamt	20 µl

Die Ansätze wurden durch Auf- und Abpipettieren gemischt, in einen PCR-Thermocycler gegeben und dort nach 2 minütiger Denaturierungszeit bei 96°C 25 Zyklen mit folgendem Profil unterworfen:

Denaturierung	96°	45 s
Anlagerung	50°	1 Min.
Polymerisierung	60°	4 Min.

Um die Produkte von überschüssigen, farbstoffmarkierten Nukleotiden zu befreien, schloss sich eine Fällung der Produkte mit 2 µl Ammoniumacetat (7,5 mol/l) und 50 µl Ethanol (100%) an. Der Niederschlag wurde bei 14.500 x g für 15 Min. bei RT sedimentiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Nach Zugabe von 100 µl Ethanol (70%) und einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 Min. bei 14.500 x g und RT) wurde das Pellet vom Überstand befreit und 15 Min. bei RT getrocknet. Anschließend wurde es in 10 µl *MegaBACE* Ladepuffer resuspendiert. Die Auftrennung und die Identifizierung der Fluoreszenz-markierten ddNTPs sowie die Auswertung erfolgten anschließend automatisch im *MegaBACE1000 Sequence Analyzer* mit Hilfe der Software *SequenceAnalyzer V3.0(Patch#2)* von Molecular Dynamics.

Die so erhaltenen Sequenzen wurden daraufhin überprüft, ob eindeutige Peaks vorhanden waren. War dies der Fall, wurden die Sequenzen mit der Ausgangssequenz verglichen. Nur diejenigen Ansätze, in denen die gewünschten Mutationen eindeutig vorhanden waren und bei denen der Rest der Sequenz mit der Wildtypsequenz übereinstimmte, wurden weiterverwendet. Alle übrigen Klone wurden verworfen.

4.2.15 Computergestützte Sequenzanalysen

Datenbankvergleiche mit bekannten Sequenzen wurden mit Hilfe des *BLAST*-Algorithmus am *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* durchgeführt.

4.2.16 Statistische Auswertung

Die Experimente wurden jeweils mindestens dreimal wiederholt und ergaben gleichwertige Ergebnisse. Die so gewonnenen Daten wurden zu Mittelwerten \pm S.E.M. zusammengefasst. Zur Untersuchung auf signifikante Unterschiede der Ergebnisse wurde der Student's t-Test für ungepaarte Daten verwendet. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Sigma Plot 9.0 verwendet. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einem Signifikanzniveau $p < 0.05$ angenommen. Das Signifikanzniveau und der Stichprobenumfang (n) sind jeweils bei den Versuchsergebnissen angegeben.

Die EC_{50} -Werte wurden mittels nicht-linearer Regression mit dem Programm *GraphPad Prism 4.0* (GraphPad Software Inc.) ermittelt.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung des Einflusses von Fettsäuren auf die $[Ca^{2+}]_i$ und die Insulinsekretion muriner β -Zellen bei vollständiger und herabregulierter GPR40-Expression

5.1.1 Untersuchung des Einflusses von Fettsäuren auf die $[Ca^{2+}]_i$ und die Insulinsekretion muriner β -Zellen bei vollständiger GPR40-Expression

5.1.1.1 Einfluss verschiedener Fettsäuren auf die $[Ca^{2+}]_i$ primärer β -Zellen der Maus

GPR40-Expressionsstudien anderer Arbeitsgruppen hatten zeigen können, dass der GPR40-Rezeptor in pankreatischen β -Zelllinien der Maus (MIN6 und betaTC-3 Zellen) exprimiert ist (Briscoe et al. 2003, Itoh et al. 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst der Einfluss verschiedener FFS auf die $[Ca^{2+}]_i$ primärer β -Zellen der Maus untersucht werden, um dann zu klären, ob sich insgesamt ein Profil der Wirkung von Fettsäuren ergibt, das dem der Erstbeschreibung von in Reporter-Zellen exprimiertem GPR40-Rezeptor entspricht (Itoh et al. 2003, Briscoe et al. 2003, Kotarsky et al. 2003).

In einzelnen, primären β -Zellen der Maus betrug die basale $[Ca^{2+}]_i$ 113 ± 1 nM ($n = 68$ Zellen) in Gegenwart einer substimulatorischen Glukosekonzentration (5 mM). Ölsäure (100 μ M; C 18:1) verursachte einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 3 A und B). Das FFS-induzierte Ca^{2+} -Signal zeigte entweder ausbruchartige Gestalt (siehe Abb. 3 A) oder Peak-Plateau-artige Muster (vgl. auch Remizov et al. 2003). Der Ölsäure-induzierte Ca^{2+} -Anstieg war konzentrationsabhängig mit einer maximal effektiven Konzentration von 100 μ M bei 0,1% (w/v) BSA (Abb. 3 B).

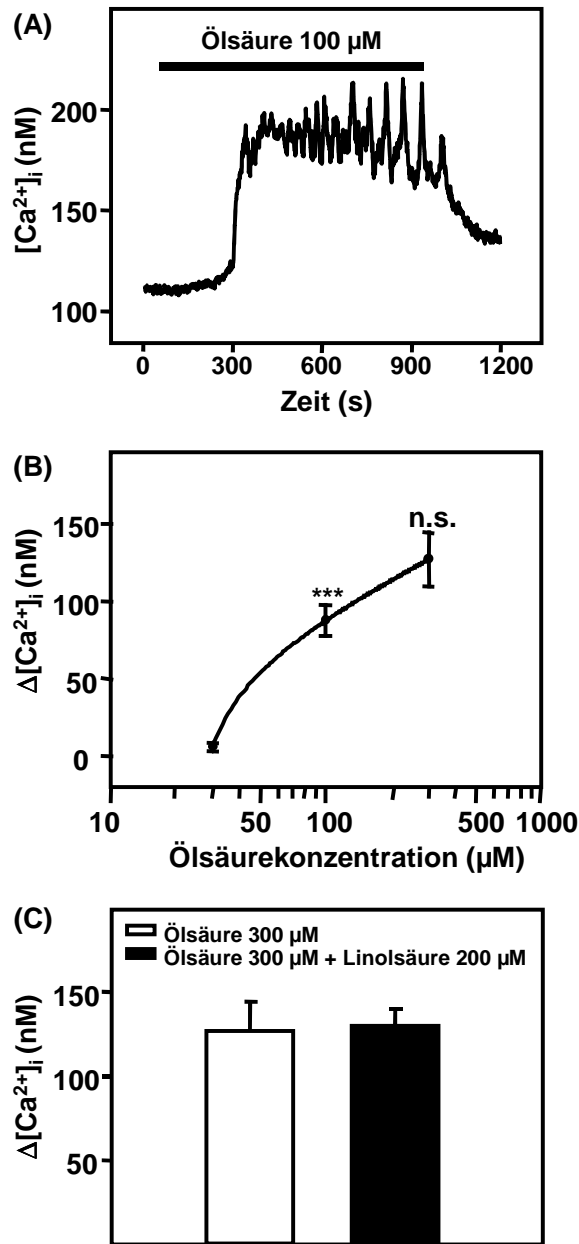


Abb. 3: Effekte von FFS auf die $[Ca^{2+}]_i$ in primären β -Zellen der Maus

(A) Fura-2-beladene primäre β -Zellen der Maus wurden mit 100 μM Ölsäure stimuliert und die $[Ca^{2+}]_i$ wurde in Einzelzellen in der angegebenen Zeit gemessen wie im Material- und Methodenteil beschrieben. Der Balken zeigt die Anwesenheit von Ölsäure in der Stimulationslösung an. Die gezeigte Spur ist repräsentativ für $n = 11$ Zellen. **(B)** Konzentrationsabhängige Effekte von Ölsäure auf die $[Ca^{2+}]_i$ in primären β -Zellen der Maus. Einzelne, Fura-2-beladene Zellen wurden mit 30, 100 und 300 μM Ölsäure stimuliert, während die $[Ca^{2+}]_i$ gemessen wurde. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm S.E.M. der Agonist-induzierten Maximalzunahme der $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) ausgelöst von der angegebenen Ölsäurekonzentration in 3 –11 Zellen. *** $p < 0.001$, 30 μM vs. 100 μM Ölsäure; n.s., nicht signifikant, 100 μM vs. 300 μM Ölsäure. **(C)** Primäre β -Zellen der Maus wurden entweder mit einer maximal-effektiven Konzentration Ölsäure (300 μM , weiße Säule) oder einer Kombinationsgabe aus maximal-effektiver Ölsäure- (300 μM) und maximal-effektiver Linolsäurekonzentration (200 μM) stimuliert (schwarze Säule), während $[Ca^{2+}]_i$ gemessen wurde. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm S.E.M. der jeweilig hervorgerufenen $\Delta[Ca^{2+}]_i$ von je drei Zellen.

Auch die mittelkettige, gesättigte Laurinsäure (C12), und die mehrfach ungesättigten, langkettigen Fettsäuren Linolsäure (C18:2) und die α -Linolensäure (C18:3) führten zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in ähnlichen Mustern. Dagegen blieb die kurzkettige Capronsäure (C6) bis hin zu Konzentrationen von 300 μ M wirkungslos (Tab. 5).

FFS	INS-1 Zellen	Primäre β -Zellen der Maus
Capronsäure (C6)	–	–
Laurinsäure (C12)	88 \pm 15 nM	22 \pm 4 nM
Myristinsäure(C14)	129 \pm 20 nM	n.e.
Palmitinsäure (C16)	172 \pm 44 nM	n.e.
Ölsäure (C18:1)	150 \pm 22 nM	88 \pm 10 nM
Linolsäure (C18:2)	115 \pm 17 nM	65 \pm 13 nM
α -Linolensäure (C18:3)	124 \pm 12 nM	41 \pm 8 nM
γ -Linolensäure (C18:3)	76 \pm 8 nM	n.e.

Tab. 5: Wirksamkeit verschiedener FFS bezüglich eines Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ in β -Zellen

INS-1 Zellen und primäre β -Zellen der Maus wurden mit verschiedenen FFS stimuliert und $[Ca^{2+}]_i$ wurde gemessen wie im Methodenteil beschrieben. Die FFS wurden mit einer Konzentration von je 100 μ M eingesetzt mit Ausnahme von Capronsäure, die mit bis zu 300 μ M Endkonzentration appliziert wurde. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm S.E.M. der Agonist-induzierten Maximalzunahme der $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) von n = 5 - 21 pankreatischen β -Zellen. n.e., nicht ermittelt.

Die Addition einer maximal effektiven Konzentration Linolsäure (200 μ M) in Gegenwart einer maximal effektiven Konzentration Ölsäure (300 μ M) verursachte keinen weiteren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in primären β -Zellen der Maus (Abb. 3 C).

5.1.1.2 Einfluss verschiedener Fettsäuren auf die $[Ca^{2+}]_i$ in INS-1 Zellen

Um die Mechanismen, die den FFS-induzierten Ca^{2+} -Signalen unterliegen, und um die potentielle Rolle von GPR40 hierbei genauer zu untersuchen, wurde in den weiterführenden Experimenten die weithin genutzte Zelllinie INS-1, die von einem Ratteninsulinom abstammt, verwendet. (Im Diskussionsteil unter 6.1 wird die Notwendigkeit hierfür ausführlich dargestellt.) Zunächst sollte geklärt werden, ob INS-1 Zellen auf eine Stimulation mit FFS ähnlich wie die primären β -Zellen der Maus reagieren würden und damit als β -Zell-Modell für die nachfolgenden Experimente geeignet wären.

Die basale $[Ca^{2+}]_i$ in unstimulierten INS-1 Zellen betrug 117 ± 10 nM ($n = 88$) in Gegenwart von 5 mM Glucose. Die Stimulation einzelner INS-1 Zellen mit verschiedenen gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigte mittel- und langkettigen FFS (100 μ M) wie Laurin- (C12), Myristin- (C14), Palmitin- (C16), Öl- (C18:1), Linol- (C18:2) sowie α - und γ -Linolensäure (C18:3) führte zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 4). Die FFS-induzierten Ca^{2+} -Signale, ausgelöst von jeder einzelnen dieser Fettsäuren, waren heterogen und zeigten Muster von ausbruchartiger und Peak-Plateau-artiger Gestalt über repetitive Ca^{2+} -Transienten bis hin zu Kombinationen aus diesen Antworttypen (Abb. 4 B-H). In dieser Hinsicht glichen die FFS-induzierten Ca^{2+} -Signale in INS-1 Zellen denen, die in primären β -Zellen der Maus beobachtet worden waren (Remizov et al. 2003 und Abb. 3). Capronsäure bis zu einer Endkonzentration von 300 μ M führte auch in INS-1 Zellen zu keinem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ wie bereits in primären β -Zellen der Maus beobachtet (Abb. 4 A und Tab. 5). Die FFS(100 μ M)-induzierten Maximalzunahmen der $[Ca^{2+}]_i$ in den β -Zellen der Ratte (INS-1) befanden sich durchweg leicht oberhalb derer von in β -Zellen der Maus beobachteten (Tab. 5).

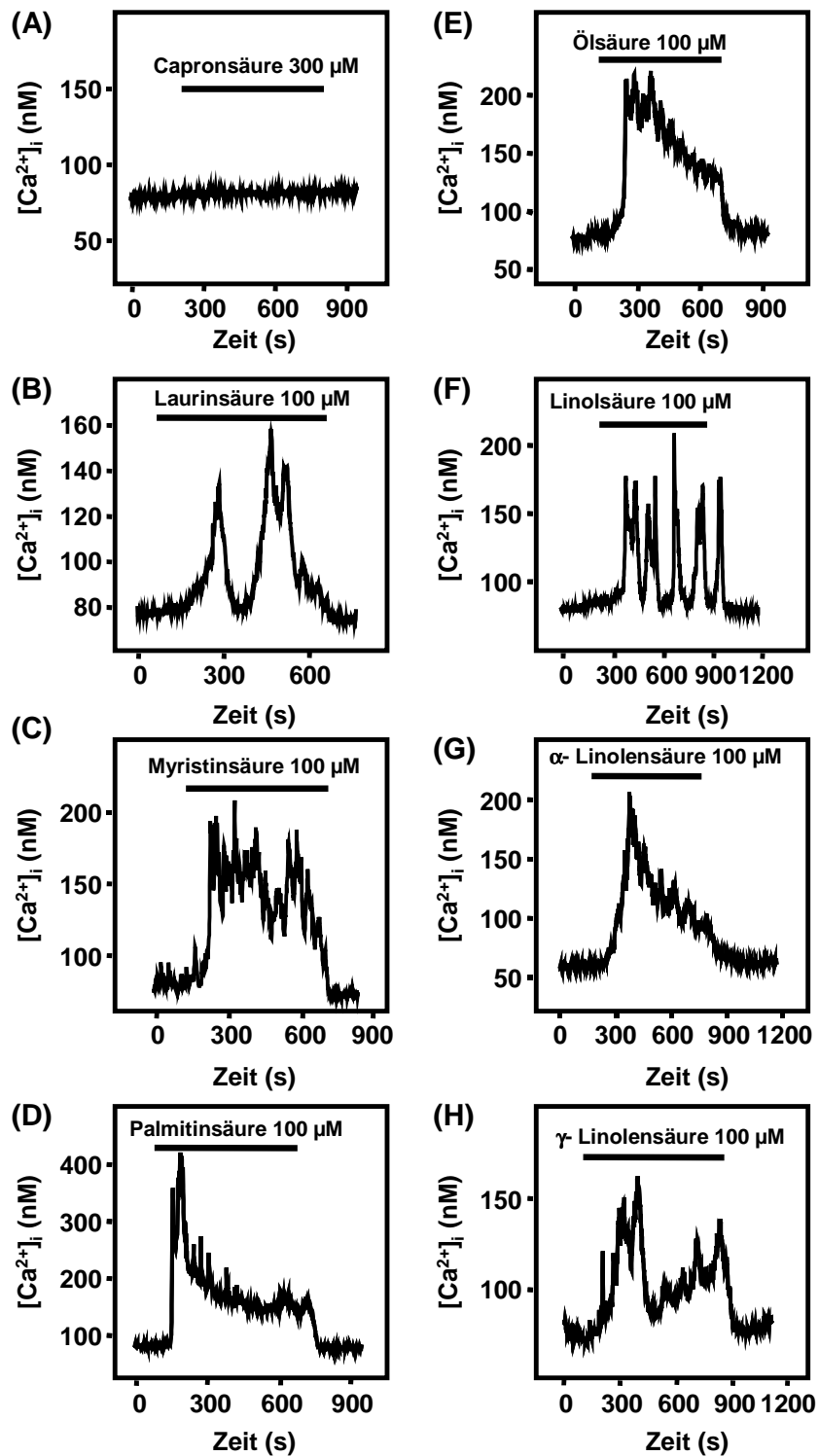


Abb. 4: FFS-induzierte Ca^{2+} -Signale in INS-1 Zellen

INS-1 Zellen wurden mit verschiedenen kurzkettigen (A), mittelkettigen (B) und langkettigen (C-H) FFS stimuliert und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde in Einzelzellen gemessen. Die Balken zeigen die Anwesenheit der jeweiligen FFS und deren Endkonzentrationen in der Stimulationslösung. Die gezeigten Spuren sind Repräsentanten von jeweils $n = 5 - 21$ Zellen. Die statistische Analyse der Daten findet sich in Tab. 5.

5.1.1.3 Mechanismen des Fettsäuren-induzierten Ca^{2+} -Signals in INS-1 Zellen

Die weitere Untersuchung der Mechanismen des FFS-induzierten Ca^{2+} -Signals in INS-1 Zellen erfolgte mit Hilfe von Ölsäure als Referenzsubstanz. Zunächst wurden die Zellen in Ca^{2+} -freiem Medium untersucht. Die basale Ca^{2+} -Konzentration in Ca^{2+} -freiem Medium betrug 109 ± 2 nM ($n = 4$). Eine Stimulation der Zellen unter diesen Bedingungen mit Ölsäure ($100 \mu\text{M}$) verursachte transiente Ca^{2+} -Anstiege in Höhe von 36 ± 9 nM ($n = 4$) oberhalb des Basalwertes, wie auch beispielhaft in Abb. 5 A gezeigt, was auf eine Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} schließen lässt.

Anschließend wurden die Zellen in Ca^{2+} -haltigem Medium mit Ölsäure stimuliert. Als das Ölsäure-induzierte Ca^{2+} -Signal eine Plateau-Phase erreicht hatte, wurde die Stimulationslösung zunächst gegen eine Ca^{2+} -freie Ölsäurelösung ausgetauscht, gefolgt von Readdition der Ca^{2+} -haltigen Ölsäurelösung. Das reversible Verschwinden des Ölsäure-induzierten Plateaus während des Ca^{2+} -Entzugs, wie in Abb. 5 B gezeigt, verdeutlichte die Notwendigkeit von extrazellulärem Ca^{2+} für die Plateauentstehung.

Im nächsten Ansatz wurden einzelne INS-1 Zellen entweder mit $100 \mu\text{M}$ Ölsäure allein oder Zellen, die bereits 5 Minuten vorher mit $50 \mu\text{M}$ Verapamil vorinkubiert worden waren, in Gegenwart von $50 \mu\text{M}$ Verapamil mit $100 \mu\text{M}$ Ölsäure stimuliert. Verapamil, das den Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ blockiert, hemmte die Ölsäure-induzierte Menge an Ca^{2+} um $59 \pm 14\%$ ($n = 5$, $p < 0,01$ vs. Kontrolle, Abb. 5 C).

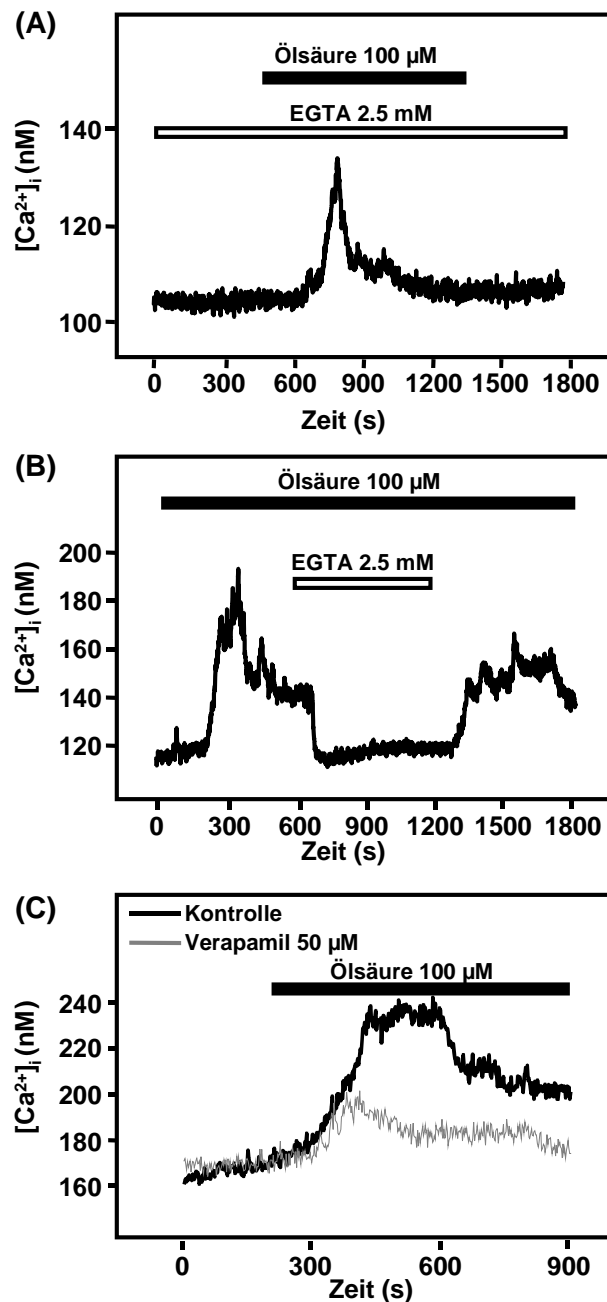


Abb. 5: Mechanismen des Ölsäure-induzierten Ca^{2+} -Signals in INS-1 Zellen

(A) INS-1 Zellen wurden in Ca^{2+} -freiem Medium mit 100 μ M Ölsäure stimuliert und die $[Ca^{2+}]_i$ wurde in einzelnen Zellen gemessen. Die gezeigte Spur ist eine Repräsentative von $n = 4$ Zellen. **(B)** INS-1 Zellen wurden in Ca^{2+} -haltigem (1,5 mM) Medium mit 100 μ M Ölsäure stimuliert. Das Ca^{2+} -haltige Medium wurde wie gekennzeichnet gegen Ca^{2+} -freies Medium ausgetauscht als das Ölsäure-induzierte Ca^{2+} -Signal ein Plateau erreicht hatte. Danach erfolgte eine Readdition von 1,5 mM Ca^{2+} in der Lösung. Eine repräsentative Spur von $n = 4$ Zellen ist abgebildet. **(C)** INS-1 Zellen wurden entweder mit 100 μ M Ölsäure allein (schwarze Spur) stimuliert oder mit 100 μ M Ölsäure in Kombination mit 50 μ M Verapamil (graue Spur; bei 5-minütiger Verapamil-Vorinkubation vorab). Die gezeigten Spuren sind repräsentativ für jeweils $n = 5$ Zellen. **(A-C)** Die Balken zeigen die Anwesenheit des jeweiligen Agonisten in der Stimulationslösung. EGTA 2,5 mM kennzeichnet die Anwesenheit von Ca^{2+} -freiem Medium.

5.1.1.4 Einfluss verschiedener Fettsäuren auf die Insulinsekretion in INS-1 Zellen

Für die folgenden Versuche wurde aus dem breiten Spektrum an Fettsäuren, die einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in pankreatischen β -Zellen hervorriefen, je eine gesättigte (Myristinsäure), eine einfach gesättigte (Ölsäure) und eine mehrfach gesättigte (Linolsäure) Fettsäure als Referenzsubstanz ausgewählt. Nun sollte der Effekt dieser FS auf die Insulinsekretion von INS-1 Zellen untersucht werden.

Nach 60-minütiger statischer Inkubation befand sich im Medium unstimulierter Kontrollzellen eine basale Insulinkonzentration von 118 ± 19 ng/ml ($n = 6$) in Gegenwart von 5 mM Glucose. Die Stimulation der INS-1 Zellen mit den Fettsäuren Öl-, Myristin- und Linolsäure in einer Endkonzentration von je 100 μ M führte im Vergleich dazu jeweils zu einer signifikant stimulierten 2,1-fach (Myristin- und Linolsäure, je $n = 6$) bis 2,4-fach (Ölsäure, $n = 6$) erhöhten Insulinkonzentration im Medium (Abb. 6).

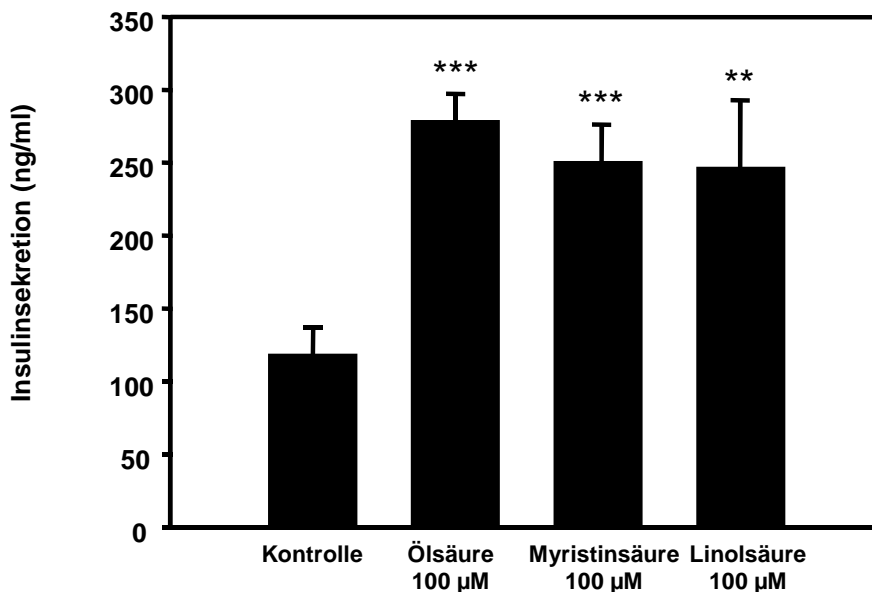


Abb. 6: FFS-induzierte Insulinsekretion aus INS-1 Zellen

INS-1 Zellen wurden in einer Zellzahl von 3×10^5 Zellen pro 35 mm-Kulturschale ausgesät. Am 5. Tag nach Aussaat wurden sie in Anwesenheit von 5 mM Glucose mit oder ohne (Kontrolle) entsprechender Fettsäure (100 μ M) einer 60-minütigen statischen Inkubation unterzogen. Die Insulinsekretion der Proben wurde mittels Bestimmung der Insulinkonzentration in den Überständen dieser Ansätze - wie im Methodenteil beschrieben - unter Anwendung eines ELISA ermittelt. Die Werte sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus $n = 6$ Proben, die aus drei unabhängigen Experimenten hervorgingen. **, $p < 0.01$ (Probe vs. Kontrolle), ***, $p < 0.001$ (Probe vs. Kontrolle).

5.1.2 Untersuchung des Einflusses von Fettsäuren auf die $[Ca^{2+}]_i$ und die Insulinsekretion bei herabregulierter GPR40-Expression

Um die Bedeutung von GPR40 bei der Generation Fettsäure-induzierter Ca^{2+} -Signale und der Fettsäure-induzierten Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen zu analysieren, sollte die GPR40-Expression in INS-1 Zellen mit Hilfe der RNAi-Technik spezifisch ausgeschaltet bzw. deutlich herabreguliert werden. Dann sollten die FFS-induzierten Effekte auf die $[Ca^{2+}]_i$ und die Insulinsekretion bei vollständiger GPR40-Expression mit denen bei herabregulierter GPR40-Expression verglichen werden. Das erforderte zunächst eine Reihe von Vorversuchen, von denen im folgenden nur die Ergebnisse der wichtigsten dargestellt werden.

5.1.2.1 Ergebnisse der Vorversuche

5.1.2.1.1 Nachweis der nativen Expression von GPR40 in INS-1 Zellen

Obwohl die durchgeführten Vorversuche mit INS-1 Zellen bereits das Vorhandensein von GPR40 nahe legten, musste dies noch nachgewiesen werden. Hierfür wurde RNA aus INS-1 Zellen isoliert und der unter Abschnitt 4.2.8 beschriebenen kompletten Genexpressionsanalyse unterzogen. Der kürzlich deorphanisierte GPR40-Rezeptor ist demnach nativ in INS-1 Zellen exprimiert wie Abb. 7 zeigt. Somit war die Eignung von INS-1 Zellen als β -Zell-Modell für die nachfolgenden Experimente geklärt.

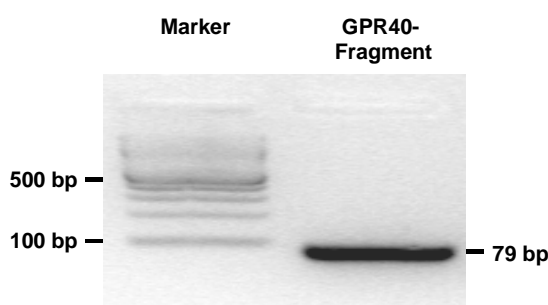


Abb. 7: GPR40 Expressions-Analyse in INS-1 Zellen

Visualisierung des in der quantitativen Real-Time-PCR amplifizierten GPR40-Produktes. Das GPR40-PCR-Produkt wurde wie im Methodenteil beschrieben amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarose-Gel analysiert; eine 100 bp DNA-Leiter diente als Marker zur Größenbestimmung. Die Ratten-GPR40-spezifischen Primer wurden so entworfen, dass bei Anwesenheit von GPR40 ein 79 bp großes Fragment entstehen sollte. Dargestellt ist das Ergebnis eines von mindestens sechs voneinander unabhängigen Experimenten.

5.1.2.1.2 Qualitätskontrolle der isolierten RNA

Zur Überprüfung der Qualität der verwendeten RNA-Präparationen wurde einerseits die optische Dichte (OD) photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt und der Quotient aus der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm, der bei einer sauberen Nukleinsäurepräparation zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte (Schrimpf 2002), errechnet. Nur diejenigen RNA-Proben, die in diesem Bereich lagen, wurden weiterverwendet. Zur Kontrolle der Integrität der RNA wurden außerdem stichprobenartig denaturierende Agarose-gelelektrophoresen durchgeführt. Alle untersuchten Proben zeigten das für intakte RNA typische Muster der 28 S und 18 S ribosomalen RNA (Abb. 8).

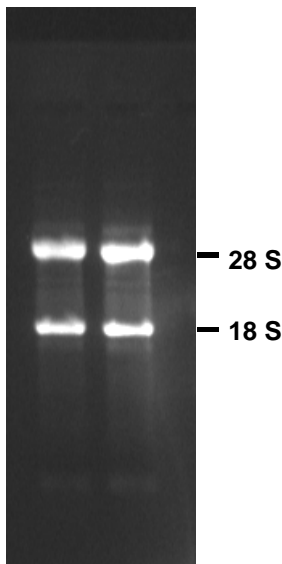


Abb. 8: Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA durch Ethidiumbromidfärbung

Je 5 µg Gesamt-RNA, die mittels des RNeasy Mini Kits aus INS-1 Zellen isoliert worden war, wurden durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese in einem Ethidiumbromid-haltigen Gel nach ihrer Molmasse getrennt und fotografiert. Die Abbildung zeigt eine Repräsentative der von n = 6 stichprobenartig durchgeführten Experimenten.

5.1.2.1.3 Etablierung eines Protokolls für die Transfektion von INS-1 Zellen mit siRNA zur spezifischen Herabregulation der GPR40-Expression

Nachdem die GPR40-Expression in INS-1 Zellen nachgewiesen war, musste ein Protokoll für die Transfektion von siRNA in INS-1 Zellen etabliert werden. Ziel war es, chemisch synthetisierte siRNA transient in INS-1 Zellen zu transfizieren, um die GPR40-Expression deutlich herabzuregulieren.

Es war nicht bekannt, ob INS-1 Zellen empfänglich für RNAi wären, weil Zellen ihre Fähigkeit zur RNAi im Laufe der Zeit verlieren können oder diese, je nachdem, aus welchem Gewebe sie gewonnen worden sind evtl. überhaupt nicht besitzen (Elbashir 2002). Zur Zeit der Untersuchungen war über die RNAi in INS-1 Zellen nichts veröffentlicht worden. Das Vorgehen der Protokolletablierung verlief wie unter 4.2.3.2.1 beschrieben. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse in Abhängigkeit von ihren Transfektionsbedingungen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Transfektionsreagenz (TR)	ausgesäte Zellzahl	siRNA:TR (µg:µl)	GPR40 mRNA-Expression 24 h nach Transfektion	GPR40 mRNA-Expression 48 h nach Transfektion	GPR40 mRNA-Expression 72 h nach Transfektion
Lipofectamine 2000					
mit Serum im Medium	3x10 ⁵	1:3	120%	56%	44%
ohne Serum im Medium	3x10⁵	1:3	113%	54%	23 ± 9%
	2x10 ⁵	1:3	106%	52%	26%
	1x10 ⁵	1:3	n.d.	n.d.	59%
RNAiFect	3x10 ⁵	1:3	n.d.	n.d.	77%
		1:6	n.d.	n.d.	99%
		1:9	n.d.	n.d.	65%
	2x10 ⁵	1:3	n.d.	n.d.	69%
		1:6	n.d.	n.d.	65%
		1:9	n.d.	n.d.	124%

Tab. 6: Einfluss der Transfektionsbedingungen bei der Transfektion von siRNA in INS-1 Zellen auf die GPR40 mRNA-Expression der Zellen

INS-1 Zellen wurden mit gegen Ratten GPR40-spezifischer siRNA (GPR40 siRNA) bzw. Negativkontrolle (NC) siRNA transfiziert. Die Transfektion erfolgte im 35 mm-Format mit den hierfür extrapolierten Herstellerangaben und den in der Tabelle angegebenen Variablen sowie einer fixen siRNA Endkonzentration von je 100 nM. Mittels der quantitativen Real-Time-PCR Expressionsanalyse wurde deren Einfluss auf die GPR40 mRNA-Expression an den verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Die angegebenen GPR40 mRNA-Expressionswerte entstammen den mit gegen Ratten GPR40-spezifischer siRNA transfizierten INS-1 Zellen und sind angegeben in % der GPR40 mRNA-Expression in mit NC siRNA transfizierten Kontrollzellen. Die Werte (± S.E.M.) entstammen je 1-3 unabhängigen Experimenten, durchgeführt im Doppelansatz. Die gelb hervorgehobenen Bedingungen wurden in das etablierte Protokoll, das für alle weiteren Experimente verwendet wurde, aufgenommen. (n.d. für „nicht durchgeführt“)

Erste Transfektionsversuche wurden mit *Lipofectamine 2000* durchgeführt. Die GPR40-Expression nach Transfektion wurde auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time PCR mit vorgeschalteter RT-PCR analysiert, da noch kein Antikörper gegen Ratten-GPR40 erhältlich war. Aus diesen Versuchen wurde ersichtlich, dass INS-1 Zellen die Fähigkeit zur RNAi besitzen, weil die

Transfektion der Zellen mit gegen GPR40 spezifischer siRNA (GPR40 siRNA) zur Herabregulation der GPR40 mRNA-Expression führte (Tab. 6). Für die Durchführung der anschließenden Experimente musste neben den Transfektionsbedingungen auch der beste Zeitpunkt bestimmt werden, da die Stabilität und die Halbwertszeit verschiedener mRNAs und ihrer Proteinprodukte sehr unterschiedlich ausfallen (Ross 1995). Die GPR40-mRNA in den mit *Lipofectamine 2000* und GPR40 siRNA transfizierten INS-1 Zellen war jeweils 72 h, also am 3. Tag nach der Transfektion, am stärksten unterdrückt. Dieser Effekt verstärkte sich mit steigender Zellzahl und war ohne Serumzusatz im Transfektionsmedium ausgeprägter als bei Anwesenheit von Serum (Tab. 6). Mit dem unter 4.2.3.2.2 beschriebenen, etablierten Protokoll zur Transfektion von INS-1 Zellen mit siRNA konnte die GPR40 mRNA-Expression in diesen Zellen spezifisch und signifikant auf 23 ± 8 % der GPR40 mRNA-Expression der mit Negativkontroll (NC) siRNA transfizierten Zellen herabreguliert werden (77 ± 8 %ige Reduktion, Abb. 9). Auf diesem in der Abbildung gezeigten Ansatz basierten die folgenden Experimente.

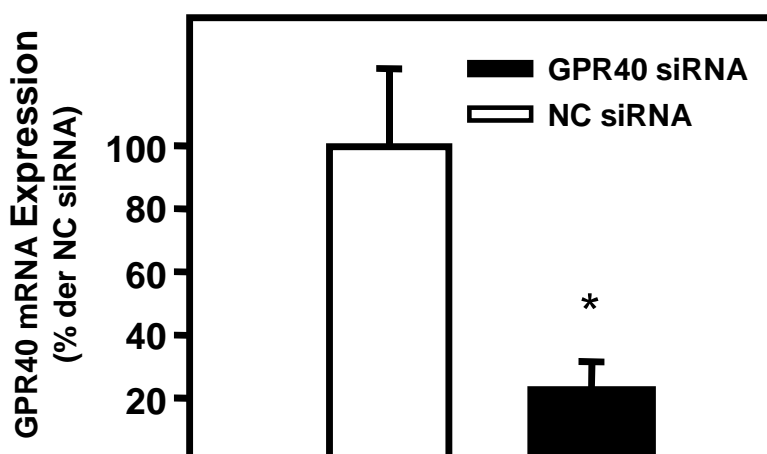


Abb. 9: GPR40-Expressionsanalyse in INS-1 Zellen nach Transfektion der Zellen mit NC siRNA bzw. GPR40 spezifischer siRNA

Quantitative Real-Time PCR Expressionsanalyse der GPR40 mRNA in INS-1 Zellen, die drei Tage zuvor mit negativer Kontroll-siRNA (NC siRNA, weiße Säule) oder GPR40 spezifischer siRNA (schwarze Säule) transfiziert worden waren. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm S.E.M. aus drei unabhängigen Experimenten, die im Doppelansatz durchgeführt wurden. * $p < 0.05$.

Mit RNAiFect konnten unter keinen getesteten Bedingungen bessere Ergebnisse erzielt werden als mit *Lipofectamine 2000* (Tab. 6). Die Transfektion von INS-1 Zellen mit NC siRNA hatte keinen signifikanten Effekt auf die Expression von GPR40 mRNA verglichen mit untransfizierten INS-1 Zellen (n = 3, n.s.), wodurch unspezifische Effekte der siRNA in der gewählten Konzentration ausgeschlossen werden können. In den folgenden Experimenten wurden jedoch weiterhin die mit NC siRNA transfizierten Zellen als Kontrolle eingesetzt, da sie die Spezifität der Herabregulation durch GPR40 siRNA verdeutlichen (Echeverri et al. 2006, Elbashir et al. 2002).

5.1.2.2 Einfluss der GPR40-Herabregulation auf das Fettsäure-induzierte Ca²⁺-Signal

Der Abbau der komplementären mRNA durch Transfektion mit siRNA ist transient und hat zur Folge, dass die Translation des Zielproteins für eine gewisse Zeit unterbunden wird (Elbashir et al. 2001). Generell wird der Zeitpunkt, an dem sich die spezifische Reduktion der Genexpression auf Proteinebene zeigt, mit 12-24 h nach der Reduktion der entsprechenden mRNA angegeben (Amara 2006, Dharmacon, Inc. 2004). Dementsprechend wurde die funktionelle Analyse der mit siRNA transfizierten INS-1 Zellen am 4. Tag und am 5. Tag nach der Transfektion durchgeführt.

Die funktionelle Analyse der mit siRNA transfizierten INS-1 Zellen zeigte, dass sich das Ölsäure-induzierte Ca²⁺-Signal in den mit NC siRNA transfizierten Zellen nicht von dem in untransfizierten Zellen unterschied (Abb. 10 A und B). Der von 100 µM Ölsäure-induzierte maximale Anstieg der [Ca²⁺]_i betrug 262 ± 13 nM (n = 382 Zellen) in mit Negativkontroll (NC) siRNA transfizierten Zellen und 282 ± 23 nM (n = 118 Zellen) in untransfizierten Zellen (n.s. untransfiziert vs. NC siRNA transfiziert). Im Gegensatz dazu war das Ölsäure-induzierte Ca²⁺-Signal der Zellen, die mit gegen GPR40 spezifischer siRNA (GPR40 siRNA) transfiziert worden waren, fast komplett gehemmt verglichen mit dem in NC siRNA transfizierten Zellen (Abb. 10 B und C). Um zielunspezifische Effekte auf andere Komponenten, die an der Ca²⁺-Signaltransduktion über Gα_q-Rezeptor Aktivierung

oder metabolische Wege in β -Zellen beteiligt sind, ausschließen zu können, wurden die transfizierten Zellen mit Arginin-Vasopressin (AVP, 100 nM), das einen an $G\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptor aktiviert, sowie mit hoher Glucosekonzentration (25 mM) stimuliert. Die durch AVP (100 nM) stimulierten Ca^{2+} -Signale waren in den Zellen, die mit GPR40 siRNA transfiziert worden waren, vollkommen unbeeinträchtigt (Abb. 10 D). Der durch AVP (100 nM) ausgelöste maximale Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ betrug 103 ± 24 nM ($n = 86$ Zellen) in untransfizierten Zellen, 93 ± 10 nM ($n = 98$ Zellen) in mit NC siRNA transfizierten Zellen und 91 ± 5 nM ($n = 96$ Zellen) in Zellen, die mit GPR40 siRNA transfiziert worden waren (n.s. untransfiziert vs. NC siRNA transfiziert, n.s. GPR40 siRNA vs. NC siRNA). Ebenso blieb das durch Glucose (25 mM) induzierte Ca^{2+} -Signal in INS-1 Zellen, die mit GPR40 siRNA transfiziert worden waren, unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Die von anderen als GPR40-Agonisten identifizierten FFS stimulierten Ca^{2+} -Signale, wie die der gesättigten FFS Myristinsäure (100 μ M) und die der mehrfach ungesättigte FFS Linolsäure (100 μ M), wurden wiederum signifikant durch die GPR40 siRNA-Transfektion gehemmt (Abb. 11 A).

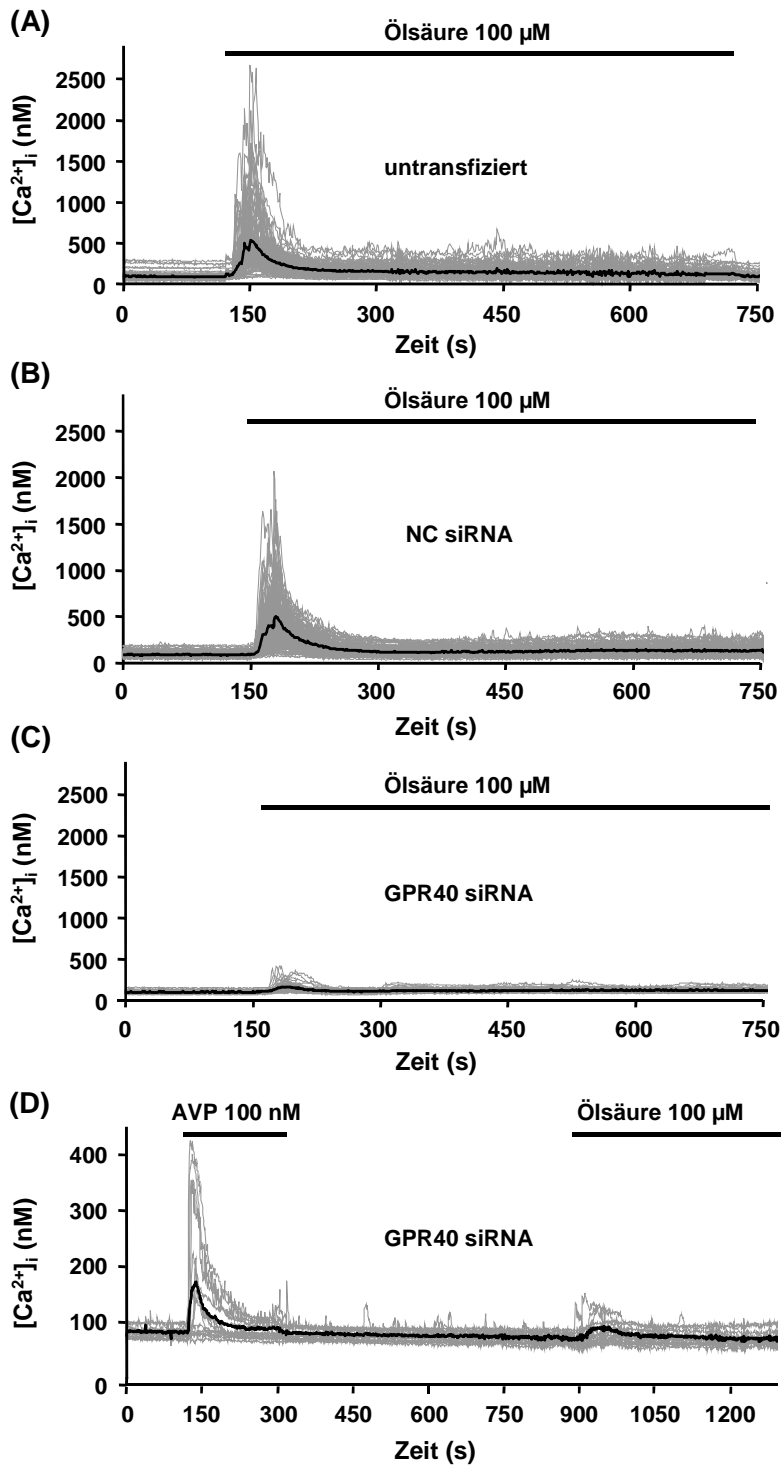


Abb. 10: Einfluss der siRNA-Behandlung auf die Ölsäure- und AVP-induzierten Ca²⁺-Signale in INS-1 Zellen

Untransfizierte (A), mit NC siRNA transfizierte (B) und mit GPR40-spezifischer siRNA transfizierte (C und D) INS-1 Zellen wurden mit 100 µM Ölsäure (A-C) bzw. mit 100 nM AVP und 100 µM Ölsäure stimuliert (D) und die [Ca²⁺]_i wurde über den angegebenen Zeitraum gemessen wie im Methodenteil beschrieben. (A-D) Die Abbildungen zeigen jeweils repräsentative Spuren von je n = 3 - 6 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die jeweiligen Mittelwerte sind dem Text sowie Abb. 11 zu entnehmen. Die Ölsäure- und AVP-induzierten Ca²⁺-Signale wurden in einzelnen Fura-2-beladenen INS-1 Zellen bestimmt (graue Linien). Die Mittelwerte der [Ca²⁺]_i sind jeweils in Form der schwarzen Linien hervorgehoben. Die Balken zeigen die Anwesenheit der jeweiligen Agonisten in der Messlösung.

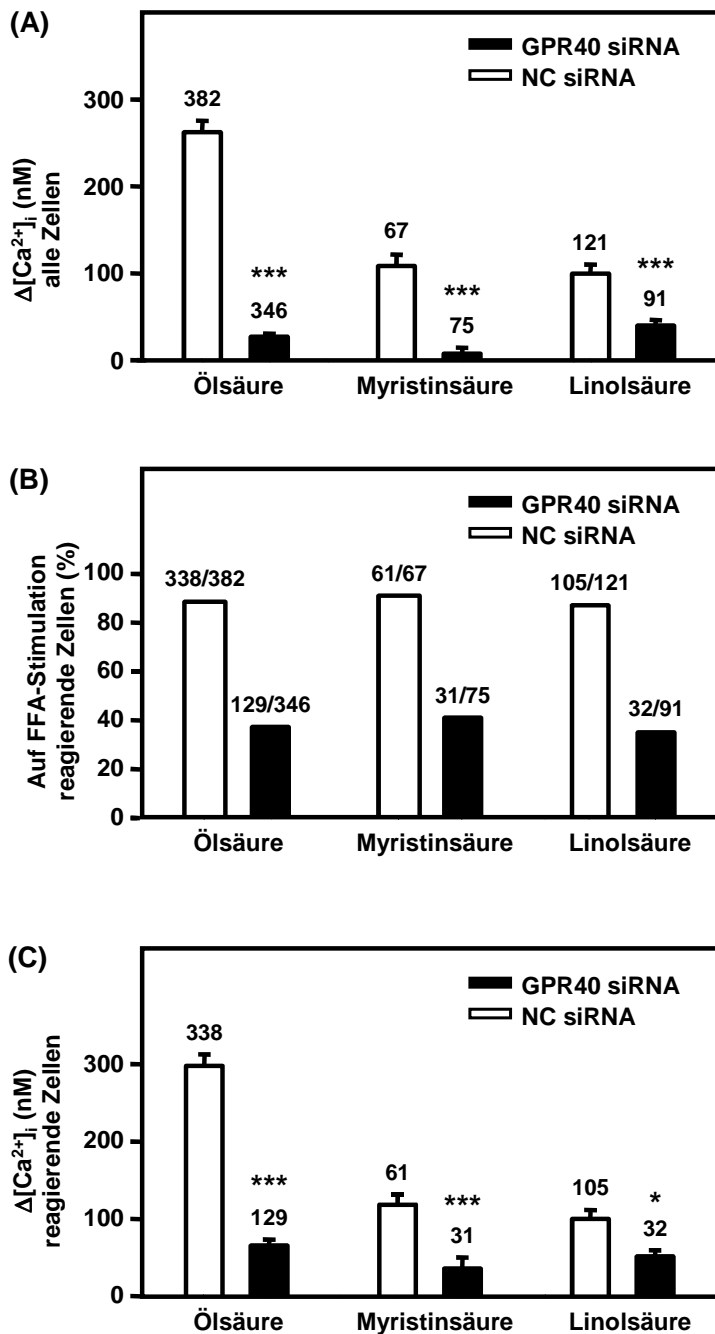


Abb. 11: Einfluss der siRNA-Transfektion auf das FFS-induzierte Ca^{2+} -Signal in INS-1 Zellen

(A-C) INS-1 Zellen, die entweder mit NC siRNA (weiße Säulen) oder mit GPR40-spezifischer siRNA (schwarze Säulen) transfiziert worden waren, wurden mit 100 μ M der jeweiligen FFS stimuliert und $[Ca^{2+}]_i$ wurde gemessen wie in Abb. 10 beschrieben. (A) Der $\Delta[Ca^{2+}]_i$ des FFS (100 μ M)-induzierten Ca^{2+} -Signals aller mit NC siRNA und GPR40-spezifischer siRNA transfizierter INS-1 Zellen ist gezeigt. Die Zahlen zeigen an, wie viele Zellen jeweils untersucht wurden. (B) Prozentualer Anteil derjenigen INS-1 Zellen, die auf FFS (100 μ M)-Stimulation mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in mit NC siRNA und GPR40-spezifisch transfizierten Zellen reagierten. Die absoluten Zahlen sind jeweils oberhalb angegeben. (C) Der $\Delta[Ca^{2+}]_i$ des FFS (100 μ M)-induzierten Ca^{2+} -Signals derjenigen INS-1 Zellen, die mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ auf die FFS-Stimulation reagierten (siehe B) nach Transfektion mit NC siRNA oder GPR40 siRNA. (A-C) Die Daten sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus 3 – 6 unabhängigen Experimenten. *, $p < 0.05$ mit NC siRNA vs. mit GPR40 siRNA transfizierte Zellen, ***, $p < 0.001$ mit NC siRNA vs. mit GPR40 siRNA transfizierte Zellen.

Das signifikant gehemmte Ca^{2+} -Signal kam zum einen dadurch zu Stande, dass nur noch wesentlich weniger Zellen überhaupt auf den FFS-Stimulus reagierten (Abb. 11 B), zum anderen fand sich aber auch in den Zellen, die auf den FFS-Stimulus reagierten eine stark reduzierte Ca^{2+} -Antwort (Abb. 11 C). Diese Ergebnisse glichen denen, die mit Ölsäure als Agonist gemacht worden waren

(Abb. 10 und 11). Wird der Einfluss der GPR40-Herabregulation auf das FFS-induzierte Ca^{2+} -Signal für alle drei untersuchten FFS zusammengefasst, so ergibt sich, dass die $77 \pm 8\%$ ige Reduktion der GPR40 mRNA-Expression mit einer $81 \pm 10\%$ igen Reduktion des FFS-induzierte Ca^{2+} -Signals einhergeht.

5.1.2.3 Einfluss der GPR40-Herabregulation auf die FS-induzierte Insulinsekretion

Nun wurde die Rolle von GPR40 bei der FFS-induzierten Insulinsekretion in INS-1 Zellen untersucht (Abb. 12). Nach 60-minütiger statischer Inkubation befand sich im Medium von mit NC siRNA transfizierten INS-1 Zellen eine Insulinkonzentration von 96 ± 10 ng/ml ($n = 15$) in Gegenwart von 5 mM Glukose. Die basale Insulinkonzentration von mit NC siRNA transfizierten INS-1 Zellen unterschied sich nicht signifikant von der in untransfizierten INS-1 Zellen gemessenen basalen Insulinkonzentration (vgl. 5.1.1.4, n.s. NC transfiziert vs. untransfiziert).

Eine Stimulation der mit NC siRNA transfizierten INS-1 Zellen mit 100 μM Ölsäure, 100 μM Myristinsäure bzw. 100 μM Linolsäure führte jeweils zu einem signifikanten Anstieg der Insulinsekretion. Wie bei untransfizierten INS-1 Zellen beobachtet (vgl. 5.1.1.4), verursachte die Stimulation der Zellen mit 100 μM Myristinsäure bzw. 100 μM Linolsäure einen 2,1-fachen ($p < 0,001$ Myristinsäure vs. Kontrolle, $p < 0,001$ Linolsäure vs. Kontrolle) und die Stimulation mit 100 μM Ölsäure einen 2,4-fachen Anstieg der Insulinsekretion im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen ($p < 0,001$ Ölsäure vs. Kontrolle). Auch die Behandlung der mit NC siRNA transfizierten INS-1 Zellen mit 100 nM AVP und 25 mM Glukose führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikant stimulierten 1,9-fach (AVP, $p < 0,001$ vs. Kontrolle) bzw. 2,6-fach (Glukose, $p < 0,001$ vs. Kontrolle) erhöhten Insulinsekretion (siehe Abb. 12).

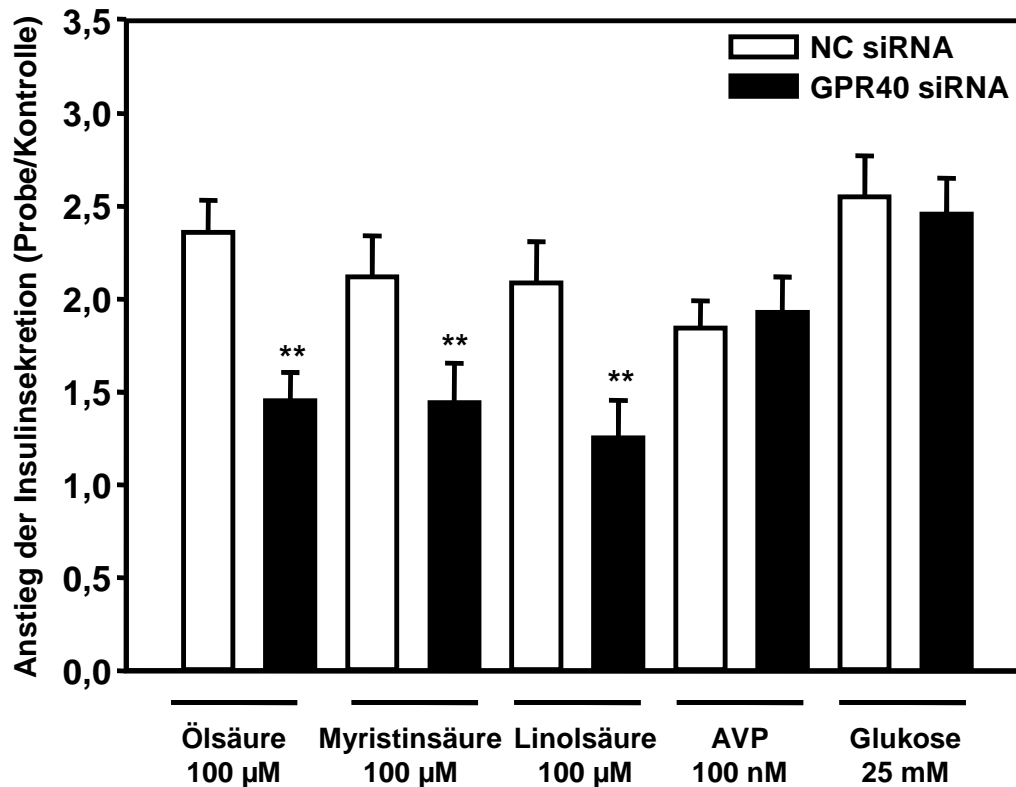


Abb. 12: Einfluss der siRNA-Behandlung auf die FS-induzierte Insulinsekretion aus INS-1 Zellen

INS-1 Zellen, die entweder mit NC siRNA (weiße Säulen) oder mit gegen GPR40-spezifischer siRNA (schwarze Säulen) transfiziert worden waren, wurden entweder nicht (nicht zu sehende Kontrollen) oder mit 100 µM der jeweiligen FFS bzw. mit 100 nM AVP oder 25 mM Glukose stimuliert und sodann einer 60 minütigen statischen Inkubation unterzogen wie im Methodenteil beschrieben. Die Insulinsekretion der Proben wurde mittels Bestimmung der Insulinkonzentration in den Überständen dieser Ansätze unter Anwendung eines ELISA ermittelt. Die Daten sind ausgedrückt als x-Facher Anstieg der Insulinsekretion im Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle, d.h. der basalen Insulinsekretion. Es handelt sich um Mittelwerte \pm S.E.M. aus je $n = 9 - 25$ Proben, die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten hervorgingen. AVP, Arginin-Vasopressin, **, $p < 0.01$ (NC siRNA vs. GPR40 siRNA).

In mit GPR40 siRNA transfizierten INS-1 Zellen betrug die basale Insulinkonzentration der Kontrollen 92 ± 17 ng/ml und unterschied sich nicht signifikant von der in mit NC siRNA transfizierten INS-1 Zellen (n.s. GPR40 siRNA transfiziert vs. NC siRNA transfiziert).

Während die Stimulation der mit GPR40 siRNA transfizierten INS-1 Zellen mit 100 nM AVP und 25 mM Glukose auch hier im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikant stimulierten Insulinsekretion führte (1,9-fach [AVP, $p < 0,001$ vs. Kontrolle] bzw. 2,5-fach [Glukose, $p < 0,01$ vs. Kontrolle]), löste die Stimulation der

Zellen mit den drei Fettsäuren (je 100 μM) keinen signifikanten Anstieg der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle aus (n.s. Ölsäure vs. Kontrolle, n.s. Myristinsäure vs. Kontrolle, n.s. Linolsäure vs. Kontrolle). Die durch die verschiedenen Fettsäuren ausgelöste Insulinsekretion in den mit GPR40 siRNA transfizierten Zellen war signifikant verringert im Vergleich zu den NC siRNA transfizierten Zellen und betrug nur das 1,3- (Linolsäure, n.s. vs. Kontrolle) bzw. das 1,4-fache (Ölsäure und Myristinsäure, beide n.s. vs. Kontrolle) des Basalwertes (siehe Abb. 12). Der Anstieg der Fettsäure-induzierten Insulinsekretion über den Basalwert hinaus war in mit GPR40 siRNA transfizierten INS-1 Zellen im Vergleich zu mit NC siRNA transfizierten im Durchschnitt um $69 \pm 3\%$ ($n = 52$) reduziert.

5.2 *In vitro*-Untersuchung der funktionellen Relevanz natürlich vorkommender Mutationen des humanen heterolog in HEK-293 Zellen exprimierten GPR40

Die vorangehenden, im murinen System gewonnenen, Ergebnisse zeigen, dass der GPR40-Rezeptor an der Generation FS-induzierter Ca^{2+} -Signale und der FS-stimulierten Insulinsekretion pankreatischer β -Zellen beteiligt ist. Damit unterstützen sie Beobachtungen, die mit murinem und humanem heterolog in CHO-, HeLa bzw. HEK-293 Zellen exprimiertem GPR40 gemacht worden waren (Briscoe et al. 2003, Itoh et al. 2003, Kotarsky et al. 2003).

In der Literatur sind zwei natürlich vorkommende Mutationen des GPR40-Rezeptors beim Menschen beschrieben (Hamid et al. 2005, Ogawa et al. 2005). Im folgenden sollte geklärt werden, ob diese Mutationen zu einer Funktionsveränderung des GPR40-Rezeptors führen, was ein verändertes Insulinsekretionsvermögen zur Folge haben könnte.

Um die funktionelle Relevanz der beschriebenen GPR40-Mutationen zu untersuchen, wurde mit humaner GPR40 (hGPR40) cDNA, die sich in dem Expressionsplasmid pCDN befand, gearbeitet (siehe Tab. 3). Zur Untersuchung *in vitro* sollte das hGPR40-Rezeptor enthaltende Plasmid transient in eukaryotischen Zellen exprimiert werden. Als Expressionssystem war die Zelllinie HEK-293 vorgesehen.

5.2.1 Ergebnisse der Vorversuche

5.2.1.1 Etablierung eines Transfektionsprotokolls für die heterologe Expression von hGPR40 in HEK-293 Zellen

Zunächst musste ein für die anstehenden Experimente geeignetes Protokoll etabliert werden, mit dem der hGPR40-Rezeptor transient in HEK-293 Zellen exprimiert werden konnte. Dazu wurden Testtransfektionen unter Verwendung des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) als Reportersystem durchgeführt, um Transfektionsbedingungen zu finden, die zu einer möglichst hohen

Transfektionseffizienz führen. Neben der Auswahl des Transfektionsreagenzes mussten die für die Transfektion auszusäende Zellzahl, der Zeitpunkt für die Durchführung der geplanten Experimente, die einzusetzende DNA-Menge und das Verhältnis von Transfektionsreagenz zu Plasmid-DNA bestimmt werden. Das Vorgehen bei der Transfektionsprozedur lief ab wie unter 4.2.4.1 beschrieben. Die Transfektionseffizienz eines jeden Ansatzes wurde jeweils 24 h bzw. 48 h nach der Transfektion bestimmt und in der Tabelle 7 in Abhängigkeit von den Transfektionsbedingungen dargestellt:

Transfektionsreagenz (TR)	ausgesäte Zellzahl	eingesetzte DNA-Menge	TR:DNA (µl: µg)	Transfektionseffizienz 24 h nach Transfektion	Transfektionseffizienz 48 h nach Transfektion
Lipofectamine 2000					
mit Serum im Medium	7,5x10 ⁵	4 µg	2,5:1	40%	55%
	9x10 ⁵	4 µg	2,5:1	50%	85%
	1x10 ⁶	4 µg	2,5:1	50%	85%
ohne Serum im Medium	7,5x10 ⁵	4 µg	2,5:1	40%	50%
	9x10 ⁵	4 µg	2,5:1	50%	85%
	1x10 ⁶	4 µg	2,5:1	60%	85%
FuGENE 6	3x10 ⁵	1 µg	3:1	n.d.	80%
mit Serum im Medium	3,5x10 ⁵	1 µg	3:1	n.d.	85%
	4x10 ⁵	1 µg	3:1	n.d.	88 ± 5%

Tab. 7: Für die Etablierung eines Transfektionsprotokolls von Plasmid-DNA in HEK-293 Zellen eingesetzte, variable Parameter und deren Einfluss auf die Transfektionseffizienz in HEK-293 Zellen

HEK-293 Zellen wurden mit einem GFP-exprimierendem Plasmid transfiziert wie unter 4.2.4.1 beschrieben. Die Transfektion erfolgte im 35 mm-Format nach Herstellerangaben und den in der Tabelle angegebenen Variablen. Deren Einfluss auf die Transfektionseffizienz wurde wie unter 4.2.4.2 beschrieben 24 h bzw. 48 h nach der Transfektion bestimmt. Die angegebenen Werte für die Transfektionseffizienz geben den Prozentsatz transfizierter Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der überlebenden Zellen an. Die Werte (± S.E.M.) entstammen je 1-3 unabhängigen Experimenten. Die gelb hervorgehobenen Bedingungen wurden in das etablierte Protokoll für alle weiteren Experimente aufgenommen. (n.d. für „nicht durchgeführt“)

Die ersten Versuche wurden mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 gemacht. Es zeigte sich, dass die Transfektionseffizienz unter den gewählten Bedingungen mit steigender Zellzahl zunahm, 48 h nach der Transfektion signifikant höher war als nach 24 h ($p < 0,01$ 48 h vs. 24 h, je $n = 6$). Es machte keinen Unterschied, ob das Transfektionsmedium Serum enthielt oder serumfrei war (n.s. mit Serum vs. ohne Serum, je $n = 6$). Gute Transfektionseffizienzen um ca. 85% konnten 48 h nach der Transfektion nach Aussaat hoher Zellzahlen um 1

Mio. Zellen/3,5 cm-Schale erreicht werden. Wegen der schnellen Verdopplungszeit der HEK-293 Zellen waren die Deckgläschen zu diesem Zeitpunkt allerdings schon so dicht mit den Zellen bewachsen, dass diese wegen der großen Zelldichte nicht mehr besonders adhärent waren. Dadurch lösten sie sich während der Belade- und Waschprozedur in Vorbereitung auf die Ca^{2+} -Experimente in Riesenclustern von den Deckgläschen ab und waren somit für die Experimente nicht zu gebrauchen. Deshalb musste ein Transfektionsreagenz gefunden werden, bei dem ähnlich gute Transfektionseffizienzen auch bei Einsatz geringerer Zelldichten erzielt werden konnten. Das war bei Fugene 6 der Fall. Bei Aussaat von nur 400.000 Zellen/35 mm-Schale mit Serum während der Transfektion wurden vergleichbar gute bis bessere Transfektionseffizienzen erreicht (siehe Tab. 7 und Abb. 13). Die eingesetzte Menge an DNA betrug 1 μg , das Verhältnis von Transfektionsreagenz/DNA war 3:1.

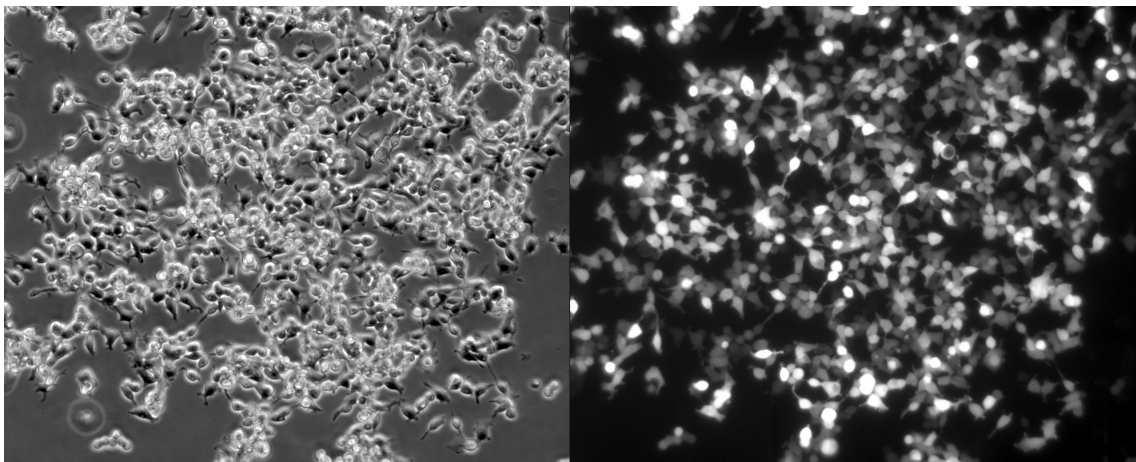


Abb. 13: Mikroskopische Darstellung von mit GFP transfizierten HEK-293 Zellen

HEK-293 Zellen wurden mittels Fugene 6 - wie unter 4.2.4.3 beschrieben - mit einem GFP-enthaltenden Expressionsplasmid transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen im Mikroskop zur Bestimmung der Transfektionseffizienz betrachtet und fotografiert. Das linke Bild zeigt die Zellen bei Durchlicht abgebildet, während sie im rechten Bild im Fluoreszenz-Modus (Anregung bei 395 nm, Emission bei 509 nm) gezeigt werden. Die im rechten Bild fluoreszierenden Zellen sind GFP-positiv.

Mit diesem, unter Abschnitt 4.2.4.3 im Detail aufgeführten, Transfektionsprotokoll überstanden die Zellen 48 h nach der Transfektion auch die für die Ca^{2+} -Messungen nötigen Vorbereitungsschritte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die

HEK-293 Zellen künftig nach diesem Protokoll mit dem hGPR40-enthaltenden Plasmid transfiziert.

5.2.1.2 Herstellung der GPR40-Mutationen mittels zielgerichteter Mutagenese

Bei den in der Literatur beschriebenen, natürlich vorkommende Mutationen des humanen GPR40-Rezeptors handelt es sich zum einen um eine selten vorkommende Asp175Asn Mutation (Hamid et al. 2005), zum anderen um einen Arg211His Polymorphismus (Ogawa et al. 2005, Hamid et al. 2005, Haga et al. 2002). Zunächst wurden die Mutationen aus dem Wildtyp(wt)-Rezeptor erzeugt, um dann untersuchen zu können, ob sie zu einer Funktionsveränderung des GPR40-Rezeptors führen. Dazu mussten Punktmutationen in die Nukleotidsequenz des GPR40-wt-Rezeptors eingeführt werden, die zur gewünschten Änderung der Aminosäuresequenz führten. Im Falle der Asp175Asn Mutation musste das Ursprungscodon GAC zum AAC und bei dem Arg211His Polymorphismus das Wildtypcodon CGC zu einem CAC mutiert werden (siehe Abb.17).

Der humane wt-GPR40-Rezeptor, subkloniert in pCDN, wurde freundlicherweise von Dr. Celia Briscoe, GlaxoSmithKline, North Carolina, U.S.A. zur Verfügung gestellt. Da der Expressionsvektor pCDN ein geheimer Hausvektor von GlaxoSmithKline ist und nicht viel an Informationen bekannt gegeben wurde, auch nicht, wie das GPR40-Insert in den Vektor eingebaut war, bot sich für die zielgerichtete Mutagenese das *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene an (Prinzip siehe 4.2.10). Zunächst wurden die Mutationsprimer entworfen. Das geschah mithilfe des Computerprogramms *Oligo* (Rychlik und Rhoads 1989). Aufgrund des Sitzes der Mutationen in der umgebenden Nukleotidsequenz stellte sich bei beiden Mutationen bei dem Versuch, Primerpaare zu entwerfen, die den Vorgaben des Kit-Herstellers für gute Mutagenesebedingungen entsprachen, das Problem der Ausbildung von Haarnadelstrukturen auf hohem Energieniveau. Das ließ sich nur durch den Austausch eines weiteren Nukleotids pro Primer umgehen. Der Austausch hob

das Problem der Haarnadelbildung des Primers zwar auf, doch fügte sich natürlich noch eine zunächst nicht geplante Mutation mit in die Sequenz des wt-GRP40-Rezeptors ein (Abb. 14). Das dadurch veränderte Triplet codierte jedoch weiterhin für dieselbe Aminosäure wie zuvor („stille Mutation“, vgl. Abb. 17).

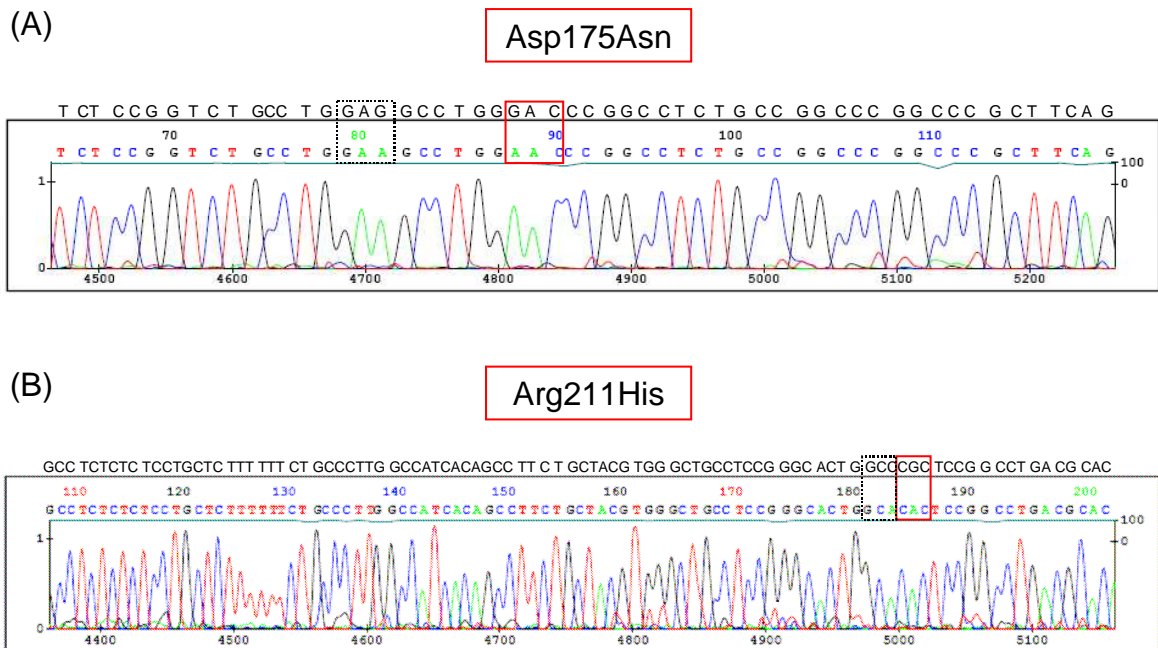


Abb. 14: Sequenzanalyse der GPR40-Mutanten

(A) Nachweis der Asp175Asn-Mutation im humanen GPR40-Rezeptor. **(B)** Nachweis der Arg211His-Mutation im humanen GPR40-Rezeptor. Gezeigt sind die jeweils relevanten Ausschnitte einer von je drei durchgeführten Sequenzanalysen mit dem MegaBACE1000 Sequence Analyser (siehe Methodenteil). Vergleichshalber ist oberhalb eines jeden Ausschnitts die entsprechende Sequenzfolge des Wildtyp-GPR40-Rezeptors, die der NCBI GenBank entnommen wurde (Zugangsnummer: AF024687), in schwarzen Buchstaben angegeben. Die Bereiche, in denen sich Wildtyp und Produkt der Sequenzanalyse unterscheiden, sind eingerahmt. Während die rot eingerahmten Codons eine Mutation enthalten, die zum Einbau einer gegenüber dem Wildtyp veränderten Aminosäure führen, codieren die durch Mutation veränderten Triplets in den schwarz gepunkteten Rahmen weiterhin für dieselbe Aminosäure (vgl. Abb. 17). Die vollständige Gensequenz des G protein-coupled receptor (GPR40) findet sich im Anhang unter 8.4.

Mit den in Tab. 1 gezeigten Mutageneseprimern und unter Anwendung des modifizierten Herstellerprotokolls (siehe 4.2.10.2) gelang es, die Asp175Asn Mutation sowie die Arg211His Mutation in den GPR40-wt-Rezeptor mit dem QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit zu erzeugen. Sie wurden mittels

DNA-Sequenzanalyse, deren Qualitätswerte in drei Wiederholungen jeweils zwischen 90-97 % lagen, nachgewiesen (Abb. 14).

5.2.2 Funktionelle Charakterisierung der GPR40-Mutationen - Einfluss der Mutationen auf die FS-induzierten Ca^{2+} -Signale

Um die funktionelle Relevanz der in der Literatur beschriebenen Mutationen (Ogawa et al 2005 und Hamid et al. 2005) *in vitro* zu untersuchen, wurden der humane wt-GPR40 Rezeptor und seine beiden mutierten Formen - die Asp175Asn-Mutante sowie die Arg211His-Mutante - transient in HEK-293 Zellen exprimiert, mit verschiedenen Fettsäure-Konzentrationen (1, 5, 10, 25, 50, 100 und 300 μM) stimuliert und deren Wirkung auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gemessen. Hierbei wurde Ölsäure als Referenzsubstanz verwendet.

Die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der GPR40-Mutanten unterschied sich nicht signifikant vom wt-Rezeptor, wo sie bei 92 ± 5 nM ($n = 6$) lag. Vergleichsweise betrug die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Asp175Asn-Mutante 96 ± 4 nM ($n = 7$, n.s. vs. wt) und in der Arg211His-Mutante 87 ± 4 nM ($n = 5$, n.s. vs. wt).

Keiner der Rezeptoren reagierte mit einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf 1 μM und 5 μM Ölsäure (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation der Rezeptoren mit den Ölsäurekonzentrationen 10, 25, 50, 100 und 300 μM lösten jeweils einen konzentrationsabhängigen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den Zellen aus. Abbildung 15 zeigt ein Beispiel einer bei Stimulation des wt-GPR40 mit den verschiedenen Ölsäurekonzentrationen entstandenen Dosis-Wirkungskurve.

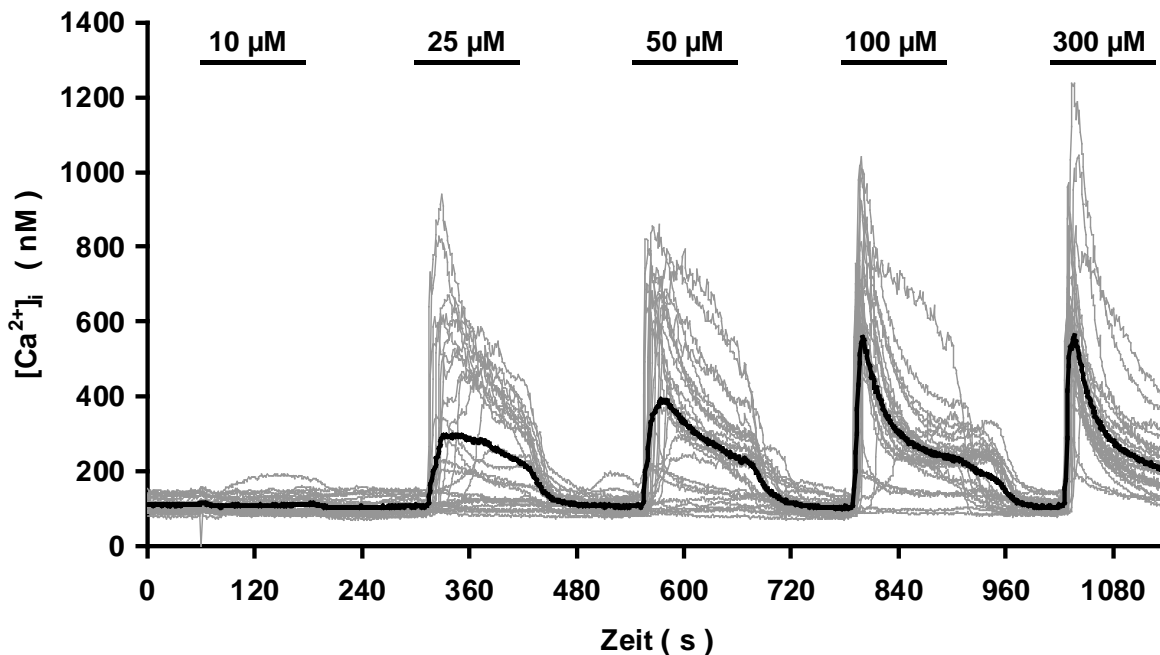


Abb. 15: Ölsäure-induzierte Ca^{2+} -Signale erzeugt am humanen heterolog in HEK-293 Zellen exprimierten GPR40-Wildtyp-Rezeptor

Der Rezeptor wurde mit verschiedenen Ölsäurekonzentrationen stimuliert und die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde über den angegebenen Zeitraum gemessen wie im Methodenteil beschrieben. Eine repräsentative Spur von $n = 6$ in drei unabhängigen Experimenten durchgeführten Messungen ist gezeigt. Die jeweiligen Mittelwerte sind in Abb. 16 eingeflossen. Die Ölsäure-induzierten Ca^{2+} -Signale wurden in einzelnen Fura-2-beladenen HEK-293 Zellen, die mit dem GPR40-Wildtyp-Rezeptor transfiziert worden waren, bestimmt (graue Linien). Die Mittelwerte der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aller in diesem Ansatz gemessenen Zellen sind in Form der schwarzen Linien hervorgehoben. Die Balken zeigen die Anwesenheit der jeweils angegebenen Ölsäurekonzentration in der Messlösung.

Die durch Stimulation mit verschiedenen Ölsäurekonzentrationen entstandenen Dosis-Wirkungskurven der Rezeptoren wurden miteinander verglichen (Abb. 16). Die Ölsäurekonzentration, die für die halbmaximale Rezeptor-Stimulation benötigt wurde (EC_{50}), gemessen am maximalen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, unterschied sich bei beiden mutierten Rezeptoren nicht von der beim Wildtyp-GPR40: Die EC_{50} -Werte inklusive ihrer in Klammern angegebenen 95%_{igen} Konfidenzintervalle waren 32 μM (23 - 45 μM) beim Wildtyp-Rezeptor, 36 μM (25 - 52 μM) bei der Asp175Asn-Mutante sowie 38 μM (28 - 51 μM) bei der Arg211His-Mutante. Auch die maximale Wirksamkeit der Ölsäure bei allen drei untersuchten Rezeptorformen war gleich. So erreichte Ölsäure unter den gegebenen Versuchsbedingungen beim Wildtyp-

GPR40 einen maximalen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ von 276 ± 45 nM, bei der Asp175Asn-Mutante von 270 ± 38 nM (n.s. vs. wt) und bei der Arg211His-Mutante von 305 ± 18 nM (n.s. vs. wt).

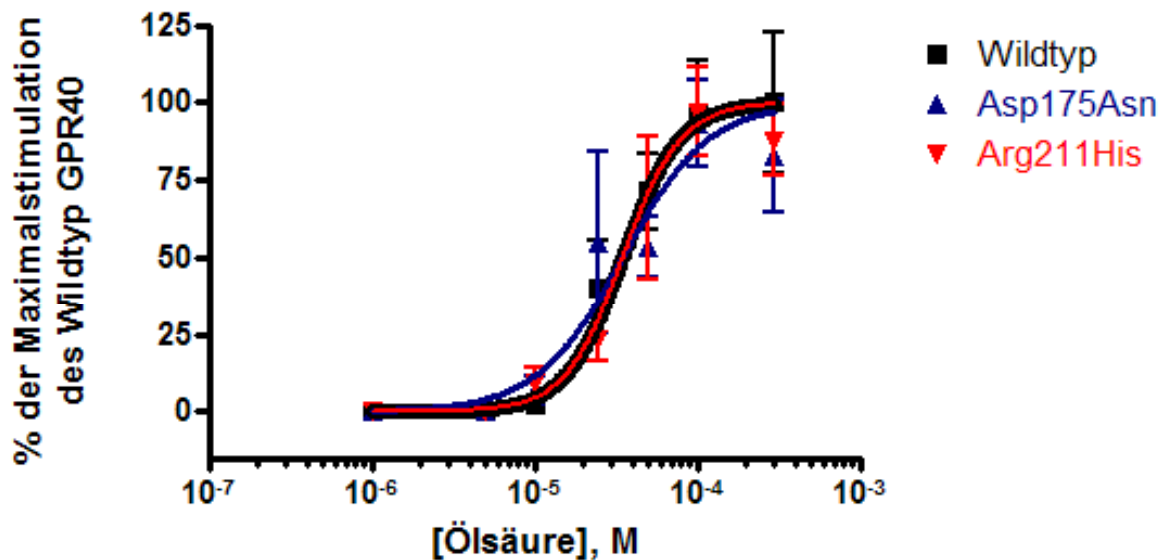


Abb. 16: Dosis-Wirkungskurven für Ölsäure am Wildtyp GPR40-Rezeptor (■) und seine beiden mutierten Formen Asp175Asn (▲) und Arg211His (▼), gemessen an der induzierten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$

Der humane Wildtyp-GPR40 Rezeptor sowie die beiden Mutanten wurden transient in HEK-293 Zellen transfiziert, mit verschiedenen Ölsäure-Konzentrationen (1, 5, 10, 25, 50, 100 und 300 μ M) stimuliert und die $[Ca^{2+}]_i$ gemessen. Die jeweils pro Ölsäurekonzentration entstandenen Mittelwerte \pm S.E.M. des maximalen Anstiegs der $[Ca^{2+}]_i$ wurden für jeden der untersuchten Rezeptoren in der Grafik in % der Maximalstimulation des Wildtyp-GPR40-Rezeptors dargestellt. Die Bestimmungen wurden in vier unabhängigen Experimenten, bei denen alle drei Rezeptoren jeweils im Doppelansatz parallel untersucht wurden, durchgeführt.

Somit konnte *in vitro* kein funktioneller Unterschied zwischen der Asp175Asn-Mutante, der Arg211His-Mutante des GPR40-Rezeptors und dem Wildtyp-GPR40-Rezeptor hinsichtlich der Generation FS-induzierter Ca^{2+} -Signale festgestellt werden (Abb. 16).

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von GPR40 für die Generation Fettsäure-induzierter Ca^{2+} -Signale und die Fettsäure-stimulierte Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen untersucht.

6.1 Auswahl eines geeigneten Modellsystems

6.1.1 Primäre β -Zellen

Ein verlässliches Modell bildet die Grundlage aller Untersuchungen. Deshalb musste im Rahmen der Arbeiten ein geeignetes β -Zellmodell ausgewählt werden. Allgemein anerkannt wird, dass die Arbeit mit primären Zellen der Arbeit mit Zelllinien vorzuziehen ist, weil keine der heute etablierten β -Zelllinien alle Kriterien nativer β -Zellen erfüllt (Hohmeier und Newgard 2004, Merglen et al. 2004). Wie in der Einleitung beschrieben, befinden sich die pankreatischen β -Zellen im Verbund mit anderen Zelltypen zusammen in den Langerhans-Inseln des Pankreas. Ein großes Hindernis in der β -Zellforschung stellt die stark begrenzte Verfügbarkeit humaner Inseln dar: so sind z.B. in den USA Inseln für ungefähr 1000 Transplantationen pro Jahr verfügbar. Dem stehen etwa 1 Millionen Patienten mit Typ 1 Diabetes entgegen, die von solchen Transplantaten profitieren würden (Hohmeier und Newgard 2004). Darum muss in der Forschung üblicherweise auf die Zellen einer anderen Spezies zurückgegriffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Vorversuche primäre β -Zellen aus der Maus, einem der bevorzugten Modellorganismen für experimentelle Untersuchungen über die Molekularbiologie der Säugetiere, isoliert und verwendet (Alberts et al. 2002). Die Arbeit mit primären β -Zellen erfordert jedoch eine große Menge isolierter pankreatischer Inseln, insbesondere, weil die Isolation nativer β -Zellen zu Primärzellkulturen führt, die nur relativ kurz -maximal 3 Tage- vital bleiben (Merglen et al. 2004, Kaiser et al. 1991). Darum müssen sehr viele Mäuse geopfert werden, und auch der zeitliche sowie der Kostenaspekt sind nicht unerheblich. Außerdem bringt die Isolation primärer β -Zellen den Nachteil einer aus β , α , δ und PP-Zellen gemischten Zellpopulation mit sich. Demgegenüber

besitzen β -Zelllinien ein nahezu unbegrenztes Teilungspotenzial und bieten sich daher für *in vitro* Untersuchungen als leicht verfügbares Modellsystem an. Die weiterführenden, auf hohen Zellzahlen basierenden Untersuchungen verlangten den Einsatz eines solchen Modellsystems.

6.1.2 Die INS-1-Zelllinie als Modellsystem

In Ermangelung einer humanen β -Zelllinie musste aus der begrenzten Anzahl an β -Zelllinien, die alle Nagern entstammen, ein geeignetes Modell für die Untersuchungen gefunden werden. In unterschiedlich starker Ausprägung besitzen alle gegenwärtig etablierten Zelllinien Besonderheiten, die sie von nativen β -Zellen unterscheiden und die berücksichtigt werden müssen (Hohmeier und Newgard 2004, Merglen et al. 2004). Für die konkrete Arbeit besitzt die weithin genutzte INS-1 Ratten-Insulinomzelllinie (Asfari et al. 1992) vergleichsweise gute Eigenschaften: Der Insulingehalt der INS-1 Zelle beträgt ca. 20% des Wertes nativer β -Zellen und liegt damit weit über dem anderer β -Zelllinien (Asfari et al. 1992, Praz et al. 1983); die Glukoseresponsivität der Zellen entspricht nahezu dem physiologischen Bereich. Zusätzlich führt die Stimulation der INS-1 Zellen mit Glukose zur Depolarisation der Zellmembran und geht mit einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ einher. Außerdem war keine Immunreaktivität für andere pankreatische Hormone wie Glukagon, Somatostatin oder Pankreatisches Polypeptid nachweisbar. Diese Merkmale belegen den erhaltenen hohen Differenzierungsgrad der Zellen und die Merkmale der Zellen bleiben über einen Zeitraum von 80 Passagen stabil (Asfari et al. 1992). Sie sind daher ein wertvolles und vielgenutztes Modellsystem für Insulinsekretionsstudien (Hohmeier und Newgard 2004, Hohmeier et al 2000).

6.2 Einfluss von Fettsäuren auf die $[Ca^{2+}]_i$ und die Insulinsekretion muriner β -Zellen bei vollständiger und herabregulierter GPR40-Expression

Der GPR40-Rezeptor ist nativ in der Ratten-Insulinomzelllinie **INS-1** exprimiert, wie auch von Shapiro et al. 2005 und Stoddart et al. 2007 bestätigt wurde.

Ein großes Spektrum an gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigten mittel- und langkettigen FFS mit mehr als 6 C-Atomen rief in Gegenwart einer substimulatorischen Glukosekonzentration einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in INS-1-Zellen hervor, während die kurzkettige FFS Capronsäure mit 6 C-Atomen keinen Einfluss auf die $[Ca^{2+}]_i$ zeigte. Dieses Profil der Wirkung mittel- und langkettiger FFS entspricht dem von heterolog in Reporter-Zellen exprimiertem GPR40-Rezeptor (Itoh et al. 2003, Briscoe et al. 2003, Kotarsky et al. 2003).

Die genauere Untersuchung des Mechanismus des FFS-induzierten Ca^{2+} -Signals mit Ölsäure als Referenzsubstanz verdeutlichte, dass an der Entstehung des FFS-induzierten Ca^{2+} -Signals sowohl die Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern als auch der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ beteiligt sind. Diese von Ölsäure induzierten Effekte auf die $[Ca^{2+}]_i$ entsprechen dem typischen Signalmuster von Agonisten, welche Rezeptoren stimulieren, die über $G\alpha_q$ den Phospholipase C (PLC)-Signalweg aktivieren (Wettschurek und Offermanns 2005, Gilon and Henquin 2001, Schöfl et al. 2000a,b, 1996b, 1995). Die Kopplung von GPR40 an $G\alpha_q$ war bereits von einer der erstbeschreibenden Gruppen (Briscoe et al. 2003) vermutet worden und rührte daher, dass diese GPR40 in CHO-Zellen transfiziert hatte, die ein $G\alpha_{q/i}$ -responsives Reportersystem exprimierten und Pertussistoxin, welches spezifisch $G\alpha_i$ -vermittelte Effekte hemmt, keinen Einfluss auf die beobachteten Signale hatte (Alberts et al. 2002, Bokoch et al. 1983).

Um die Beteiligung von GPR40 an den beobachteten Prozessen zu beweisen, wurden INS-1 Zellen mit gegen Ratten-GPR40 spezifischer siRNA transfiziert, was die GPR40 mRNA-Expression um knapp 80%, reduzierte.

In diesen Zellen war das Ölsäure-induzierte Ca^{2+} -Signal -verglichen mit den GPR40-vollexprimierenden Kontrollen- signifikant reduziert, sogar fast verschwunden. Das stark verringerte Ca^{2+} -Signal kam zum einen dadurch zustande, dass nur noch signifikant weniger Zellen überhaupt auf den FFS-Stimulus reagierten, zum anderen fand sich auch in den Zellen, die auf den FFS-Stimulus reagierten, eine signifikant verringerte Ca^{2+} -Antwort. Entsprechend einem GPR40-vermittelten Effekt wurden die gleichen Ergebnisse wie bei der einfach ungesättigten Ölsäure auch mit anderen FFS, der gesättigten Myristinsäure und der zweifach ungesättigten Linolsäure beobachtet. Sie sind -genau wie die Ölsäure- beschriebene GPR40-Agonisten (Itoh et al. 2003, Briscoe et al. 2003, Kotarsky et al. 2003). Zusammengefasst ging die knapp 80%ige Reduktion der GPR40 mRNA-Expression mit einer ca. 80%igen Reduktion des FFS-induzierten Ca^{2+} -Signals einher. Dazu im Gegensatz waren die AVP- und Glukose-stimulierten Ca^{2+} -Signale in mit GPR40-spezifischer siRNA behandelten INS-1 Zellen vollkommen unbeeinträchtigt verglichen mit den GPR40-exprimierenden Kontrollzellen. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die vorangehenden Beobachtungen durch zielunspezifische Effekte auf andere Komponenten, die an der Ca^{2+} -Signaltransduktion über $\text{G}\alpha_q$ -Rezeptor-Aktivierung oder metabolische Wege beteiligt sind, hervorgerufen wurden.

Die Beteiligung von GPR40 an der FFS-stimulierten Insulinfreisetzung wurde ebenso in RNA-Interferenz-Experimenten untersucht. In Gegenwart einer substimulatorischen Glukosekonzentration führte die Stimulation GPR40-exprimierender INS-1 Zellen mit Ölsäure, Myristinsäure und Linolsäure jeweils zu einem signifikanten 2,1- bis 2,4-fachen Anstieg der Insulinsekretion verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen. Herabregulation der GPR40-Expression in den Zellen führte hingegen zu einer signifikanten, ungefähr 70%ig reduzierten FFS-induzierten Insulinsekretion und war auch hier GPR40-spezifisch, wie die vergleichsweise Stimulation der Zellen mit AVP und Glukose zeigen konnte.

Die Hemmung der FFS-induzierten Insulinsekretion verläuft also bei GPR40-Herabregulation parallel zu einer Hemmung des FFS-induzierten Ca^{2+} -Signals. Da der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der auslösende Reiz für die Freisetzung von Insulin ist

(Alberts et al. 2004, Henquin et al. 2003), erscheint ein kausaler Zusammenhang zwischen beiden Ereignissen plausibel. Weil das Ausmaß der Hemmung auf die FFS-induzierte Insulinsekretion nach den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Untersuchungsergebnissen bei GPR40-Herabregulation jedoch etwas geringer ausfällt als die Hemmung der FFS-induzierten Ca^{2+} -Signale, erscheint es möglich, dass an der Vermittlung der FFS-induzierten Insulinsekretion noch andere, GPR40-unabhängige Mechanismen an der Vermittlung der Wirkung von FFS auf die Insulinsekretion beteiligt sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit können allerdings hierüber keinen Aufschluss geben. Andere Daten weisen jedoch darauf hin, dass diese Mechanismen möglicherweise mit dem mitochondrialen Metabolismus der FFS im Zusammenhang stehen könnten, wahrscheinlich allerdings jenseits der ATP-Entstehung (Remizov et al. 2003).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass das FFS-induzierte Ca^{2+} -Signal und die FFS-stimulierte Insulinsekretion in INS-1 Zellen hauptsächlich über Aktivierung des in diesen Zellen exprimierten GPR40-Rezeptors vermittelt werden, was sich in Übereinstimmung befindet mit kürzlich erfolgten Berichten über die gleiche Zelllinie und über primäre β -Zellen der Ratte (Shapiro et al. 2005, Fujiwara et al. 2005).

Bezüglich **primärer β -Zellen** der Maus, die in der Vergangenheit z.T. andersartige grundlegende Insulinsekretionsmechanismen gezeigt hatten als β -Zellen der Ratte (Antunes et al. 2000, Ma et al. 1995), hatten Remizov et al. 2003 im Hinblick auf die Erzeugung FFS-induzierter Ca^{2+} -Signale auf die Wichtigkeit des mitochondrialen Abbaus für die Wirkungsentfaltung der FFS hingewiesen. Diese Annahme beruhte auf den beobachteten Wirkungen der CPT-I-Hemmer 2-Bromopalmitat und Methylpalmoxirat. Der Einsatz von Methylpalmoxirat hatte zu einer deutlichen Reduktion, die Verwendung von 2-Bromopalmitat zu einem gänzlichen Verschwinden FFS-induzierter Ca^{2+} -Signale geführt (Remizov et al. 2003). Kürzlich veröffentlichte Daten (Salehi et al. 2005) zeigen jedoch, dass zumindest 2-Bromopalmitat nicht nur CPT-I spezifisch wirkt, sondern auch FFS-induzierte Effekte hemmt, die über GPR40 vermittelt werden, dessen Expression

auch in primären β -Zellen der Maus (Steneberg et al. 2005) und Mäuseinsulinomzellen (Min6; Itoh et al. 2003, Korarsky et al. 2003) nachgewiesen wurde. Das unterstützt die im Rahmen dieser Arbeit für INS-1 Zellen erhaltenen Ergebnisse insofern, als auch bei primären β -Zellen der Maus eine Hemmung von GPR40 -in diesem Fall durch Hemmung mit 2-Bromopalmitat- mit dem Verschwinden des Hauptanteils der FFS-induzierten Ca^{2+} -Signale und der FFS-induzierten Insulinsekretion einhergeht (Salehi et al. 2005).

Desgleichen verursachten sowohl gesättigte als auch einfach und mehrfach ungesättigte mittel- und langkettige FFS in primären β -Zellen der Maus einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Gegenwart von 5 mM Glukose, während die kurzkettige FFS Capronsäure diesbezüglich unwirksam war, was auch in INS-1 Zellen beobachtet wurde und dem GPR40-Agonisten-Profil entspricht (Briscoe et al. 2003, Itoh et al. 2003, Kotarsky et al. 2003). Zudem entsprach das Muster der Ca^{2+} -Signale auch dem Muster der von Remizov et al. 2003 beobachteten FFS-induzierten Ca^{2+} -Signale.

Die beobachtete Wirkung der FFS auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in β -Zellen der Maus lag insgesamt, wohl speziesspezifisch bedingt, niedriger als in den β -Zellen der Ratte (INS-1), wie ebenso bei der GPR40-Erstbeschreibung im heterologen Reporterzellsystem von Itoh et al. 2003 beobachtet (vgl. Anhang 8.3).

In Übereinstimmung mit den Charakteristika von GPCRs, folgten die FFS-induzierten Ca^{2+} -Signale in den primären β -Zellen der Maus einer Konzentrationsabhängigkeit, die in einer maximal effektiven Agonisten-Konzentration mündeten. In primären β -Zellen der Maus führte die Addition einer maximal effektiven Konzentration einer FFS in Gegenwart einer maximal effektiven Konzentration einer anderen FFS nicht mehr zu einem weiteren Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Das lässt den Schluss zu, dass beide FFS über denselben Mechanismus wirken. Naheliegend ist, dass das für GPCRs bekannte Phänomen einer Rezeptorsättigung beobachtet wurde.

Des Weiteren wurden die folgenden, im Rahmen dieser Arbeit in INS-1 Zellen gemachten Beobachtungen auch von Remizov et al. 2003 in primären β -Zellen der Maus gemacht: An der Entstehung des FFS-induzierten Ca^{2+} -Signals sind sowohl die Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern als auch der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ beteiligt.

All diese Hinweise deuten darauf hin, dass in primären β -Zellen der Maus, ebenso wie in der Ratteninsulinomzelllinie INS-1 an der Generation FFS-induzierter Ca^{2+} -Signale die Aktivierung von GPR40 beteiligt und notwendig ist. Angesichts der bedeutenden Funktion von Ca^{2+} als Triggersignal für die Insulinsekretion und den bei INS-1 Zellen in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen ist GPR40 dann wahrscheinlich auch in primären β -Zellen der Maus in die FFS-induzierte Stimulation der Insulinsekretion involviert. Inzwischen konnte der Beweis hierfür auch von anderen Arbeitsgruppen erbracht werden (Salehi et al. 2005, Steneberg et al. 2005).

Die in der Ratteninsulinomzelllinie INS-1 gemachten Beobachtungen der Bedeutung von GPR40 finden sich somit in der Spezies Maus bestätigt, so dass der beobachtete Mechanismus weder insulinomspezifisch noch spezifisch für die Ratte zu sein scheint.

Die physiologische Relevanz dieser Ergebnisse hätte mithilfe dieser Daten allein nicht vorhergesagt werden können, da im Rahmen dieser Arbeit sowohl die FFS-Konzentrationen (berechnet nach Richieri et al. 1993 ≥ 268 nM) als auch das Verhältnis von Gesamt-Fettsäurekonzentration/Albuminkonzentration (dieses lag meist bei 6, vgl. 4.2.5) höher als unter physiologischen Bedingungen waren (Poitout 2003). Jedoch ist die *in vivo*-Relevanz der Bedeutung von GPR40 für die FFS-stimulierte Insulinsekretion mittlerweile bereits, wie im Abschnitt 6.4 genauer beschrieben, bestätigt worden (Latour et al. 2007, Steneberg et al. 2005).

In wiefern die Bedeutung von GPR40 für die FFS-stimulierte Insulinsekretion des Menschen zutrifft, bleibt hypothetisch. Aufgrund der übereinstimmenden starken GPR40-Expression im Pankreas, insbesondere in den pankreatischen Inseln der

Ratte wie auch des Menschen sowie einer vergleichbaren Ligandenwirkung an Ratten-, Mäuse- und humanem GPR40 ist anzunehmen, dass dem GPR40-Rezeptor hier eine ähnliche Bedeutung zukommt (Tomita et al. 2006, 2005, Briscoe et al. 2003, Itoh et al. 2003, Kotarsky et al. 2003).

6.3 Funktionelle Relevanz natürlich vorkommender Mutationen des humanen heterolog in HEK-293 Zellen exprimierten GPR40

Die vorangegangenen, im murinen System gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die von mittel- und langkettigen FFS induzierte Insulinsekretion größtenteils über die Aktivierung von GPR40 vermittelt wird, womit sie die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen unterstützen (Briscoe et al. 2003, Itoh et al. 2003, Kotarsky et al. 2003). Die zentrale Steuerungsfunktion, die FFS im Rahmen der Nährstoff-induzierten Insulinsekretion zukommt (Gravena et al. 2002, Prentki 1996, Newgard und McGarry 1995), legt eine Beteiligung von GPR40 an der Glukosehomöostase nahe. Mutationen im GPR40-Gen könnten zu Funktionsveränderungen des Rezeptors führen, was ein verändertes Insulinsekretionsvermögen zur Folge haben könnte (Spiegel 2006). Genetischen Faktoren kommt bei der Entstehung des Typ-2-Diabetes eine wesentliche Bedeutung zu.

Trotz aufwendiger Suche nach Kandidaten-Genen im komplexen Netzwerk der Insulinsekretions-Kaskade der β -Zelle konnten bislang erst wenige, für die β -Zelldysfunktion verantwortliche molekulare Defekte, identifiziert werden. So ist es denkbar, dass Mutationen im GPR40-Gen eine Bedeutung bei der Entstehung des Typ-2-Diabetes zukommt.

Zum Zweck der funktionellen Charakterisierung wurden die beiden in der Literatur beschriebenen, beim Menschen natürlich vorkommenden GPR40-Mutationen, eine selten vorkommende Asp175Asn Mutation (Hamid et al. 2005) sowie ein Arg211His Polymorphismus (Ogawa et al. 2005, Hamid et al. 2005, Haga et al. 2002) zunächst durch Einfügung von Punktmutationen in die Nukleotidsequenz des humanen GPR40-wt-Rezeptors erzeugt. Anschließend wurden der wt-

Rezeptor und seine beiden mutierten Formen transient in HEK-293 Zellen exprimiert, mit verschiedenen FFS-Konzentrationen stimuliert und deren Wirkung auf die $[Ca^{2+}]_i$ gemessen. Der Vergleich der entstandenen Dosis-Wirkungskurven ergab, dass keine der beiden GPR40-Mutanten sich funktionell vom wt-Rezeptor unterschied.

Angeht die bedeutende Funktion von Ca^{2+} als Triggersignal für die Insulinsekretion (Alberts et al. 2004, Henquin et al. 2003) und der in INS-1 Zellen gemachten Beobachtung, dass eine Hemmung der FFS-induzierten Insulinsekretion bei GPR40-Herabregulation parallel zu einer Hemmung des FFS-induzierten Ca^{2+} -Signals verlief, erscheint es wahrscheinlich, dass die Mutationen kein verändertes Insulinsekretionsvermögen hervorrufen. Bezüglich der Typ-2-Diabetes Pathogenese kommt ihnen daher wahrscheinlich keine Bedeutung zu.

In zwei Studien (Ogawa et al. 2005, Hamid et al. 2005) konnte kein Unterschied in Bezug auf die Allelfrequenz des Arg211His-Polymorphismus bei Typ-2-Diabetikern und gesunden Menschen festgestellt werden. Das Gleiche gilt für die selten vorkommende Asp175Asn Mutation (Hamid et al. 2005). Eine der Studien hatte auch keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Varianten und klinischen oder metabolischen Besonderheiten festgestellt (Hamid et al. 2005), was die im Rahmen dieser Arbeit generierten *in vitro*-Daten unterstützt.

Jedoch hatte sich in einer Korrelationsstudie an gesunden japanischen Männern die Tendenz eines höheren Seruminsulinspiegels sowie höherer Werte bei dem Homöostasemodell von Insulinresistenz (HOMA-IR) und β -Zellfunktion (HOMA- β) bei Vorhandensein des GPR40 Arg211His-Polymorphismus im Vergleich zum Vorhandensein des Wildtyprezeptors abgezeichnet. Das ging jedoch nicht mit abnormen Glukose- oder Lipidspiegeln einher (Ogawa et al. 2005).

Diese Studie führt zu der Überlegung, dass der GPR40 Arg211His-Polymorphismus evtl. in Verbindung mit anderen genetischen Komponenten an der Entstehung des Typ-2-Diabetes beteiligt sein könnte.

6.4 Aktueller Stand der GPR40-Forschung in der pankreatischen β -Zelle und Ausblick

Die Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet der GPR40-Signaltransduktion sind so vielfältig und die Informationsflut auf diesem Gebiet ist so gewaltig, dass die eigenen Arbeiten, die zu diesem Thema gemacht wurden und in dieser Arbeit vorgestellt werden, mittlerweile beinahe veraltet erscheinen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf eine Beteiligung von GPR40 bei der FFS-stimulierten Insulinsekretion wird durch weitere *in vitro* Beobachtungen deutlich unterstützt. Wie in dieser Arbeit ging die herabregulierte bzw. ausgeschaltete GPR40-Expression mittels siRNA-Technik (Shapiro et al. 2005), Antisense-Oligonukleotiden (Salehi et al. 2005), pharmakologischer Inhibition (Briscoe et al. 2006) oder Gendelektion bei der Maus (Steneberg et al. 2005) mit der Unterdrückung der FFS-induzierten Insulinsekretion einher.

Von anderen Arbeitsgruppen wurde ebenfalls beobachtet, dass FFS-aktivierter GPR40 zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt und über $G\alpha_q$ -Kopplung die PLC aktiviert (Fujiwara et al. 2005, Shapiro et al. 2005). Eine Arbeitsgruppe berichtete zusätzlich von einer durch das cAMP/PKA-Systems ausgelösten Hemmung der K_{ATP} -Kanäle (Feng et al. 2006).

Die Beobachtung einer im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant erhöhten GPR40-Expression im Pankreas von *ob/ob*-Mäusen, die adipös, hyperglykämisch und insulinresistent sind und eine β -Zellhyperplasie aufweisen, legt auch eine Beteiligung von GPR40 bei der Vermittlung der chronischen Effekte von FFS auf die Insulinsekretion nahe (Briscoe et al. 2003).

Steneberg et al. 2005 gelang es, mit GPR40-Knockoutmäusen und GPR40-überexprimierenden Mäusen zu zeigen, dass GPR40 nicht nur die akuten, sondern auch die chronischen Effekte von FFS auf die Insulinsekretion vermittelt. Sowohl GPR40^{-/-}-Mäuse als auch GPR40^{+/+}-Mäusen nahmen während einer 8-wöchigen Diät, die zu 58 % aus Fett bestand, an Gewicht zu und wurden fettleibig. Im Gegensatz zu den GPR40^{+/+}-Mäusen entwickelten die GPR40^{-/-}-Mäuse weder eine Adipositas-assoziierte Hyperinsulinämie noch hepatische Steatose,

Hypertriglyzeridämie, Hyperglykämie oder Glukoseintoleranz. Die Überexpression von GPR40 führte bei Mäusen zur Beeinträchtigung der β -Zell-Funktion, Hypoinsulinämie und Diabetes (Steneberg et al. 2005).

Damit scheint GPR40 eine wichtige Rolle in der Ereignisfolge, die Adipositas mit der Entwicklung von Typ-2-Diabetes verbindet, zuzukommen: Im Frühstadium eines Typ-2-Diabetes, das durch Adipositas und Hyperinsulinämie charakterisiert ist, stimulieren erhöhte FFS-Spiegel GPR40, was nach anfänglich vermehrter Insulinsekretion (Hyperinsulinämie) zu einer sukzessiven Abnahme der Insulinspeicher-Reserve und damit der Insulinsekretion der β -Zellen führt. Dem folgen Hypoinsulinämie und Diabetes (Rayasam et al. 2007).

Ein sehr aktueller Bericht (Latour et al. 2007), in dem ebenfalls mit GPR40-Knockout-Mäusen gearbeitet wurde, stimmte den ersten GPR40-*in vivo*-Untersuchungen (Steneberg et al. 2005) nicht komplett zu. Die hier gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass GPR40 für die FFS-stimulierte Insulinsekretion *in vivo* zwar notwendig, aber allein nicht ausreichend ist und ungefähr für die Hälfte der Insulinantwort auf einen akuten FFS-Stimulus in Mäusen verantwortlich ist. Laut Latour et al. 2007 ist GPR40 jedoch nicht an der Vermittlung der Effekte beteiligt, die bei chronischer FFS-Exposition auftreten.

Trotz dieser Unstimmigkeiten über das Ausmaß der Bedeutung von GPR40 bei der Vermittlung der Wirkung akut erhöhter FFS-Spiegel auf die Insulinsekretion und die Beteiligung bei der Wirkungsvermittlung chronisch erhöhter FFS-Spiegel steht fest, dass die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zusammen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen einen neuen Aspekt im komplexen intermolekularen Netzwerk der Insulinsekretions-Kaskade der β -Zelle und einen Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Medikamente für die Behandlung des Typ-2-Diabetes liefern.

Während die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse im Hinblick auf eine Diabetes-Typ-2-Medikation eher an einen GPR40-Agonisten hatten denken lassen, legen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Steneberg et al. 2005 und die

Einordnung der eigenen Ergebnisse in den dadurch entstehenden Kontext eher einen GPR40-Antagonisten zur Bekämpfung des Typ-2-Diabetes nahe. Hingegen wäre entsprechend Latour et al. 2007 eher ein Agonist sinnvoll, vorausgesetzt, dieser würde auf Dauer tatsächlich nicht das Problem der „Lipotoxizität“ mit sich bringen (Rayasam et al. 2007). Demgegenüber ist der Einsatz eines GPR40-Agonisten auch in sofern in Frage zu stellen, als GPR40 in Brustkrebszellen exprimiert und hier für die Zellproliferation erforderlich ist (Hardy et al. 2005, 2003).

Genau die Frage, ob Typ-2-Diabetiker eher von einem GPR40-Agonisten oder einem GPR40-Antagonisten profitieren würden, wird auch in Expertenkreisen zur Zeit kontrovers diskutiert (Rayasam 2007). Im Forschungszentrum von Glaxo Smith Klein wird derzeit an beidem gearbeitet: sowohl an GPR40-Agonisten als auch an Antagonisten (Stoddart et al. 2007, Briscoe et al. 2006, Garrido et al. 2006). Währenddessen befasst sich die Konkurrenz Johnson and Johnson mit der Synthese von Agonisten (Song et al. 2007).

So besteht zukünftig noch großer Forschungsbedarf, bis diese Frage geklärt ist. Auch die Frage, welchen Beitrag GPR40 bei der Vermittlung der Wirkung akut erhöhter FFS-Spiegel liefert, ist zu untersuchen und ob noch andere Mechanismen an diesem Prozess beteiligt sind. Diesbezüglich legen Haber et al. 2006 und Nolan et al. 2006 im Vergleich zu dem eingangs (Abb. 2) erwähnten Modell nun ein um den GPR40-Rezeptor erweitertes, dreiarmliges Modell der Fettsäure-induzierten Signaltransduktion in der β -Zelle vor. Das ist allerdings noch nicht bis in Detail ausgereift und somit noch unvollständig und mit weiteren Fragezeichen behaftet.

Die Frage nach der Bedeutung von GPR40 im menschlichen Gehirn bleibt ebenfalls unbeantwortet. Vermutet werden kann ein Zusammenhang mit der GPR40-aktivierenden langkettigen FFS Docosahexaensäure, deren reichliches Vorkommen im Gehirn und deren Funktion bei der Neuronalentwicklung bekannt sind. Die Bedeutung und Funktion von GPR40 im Gehirn zu untersuchen ist

ebenfalls im Hinblick auf die Medikamententwicklung von Bedeutung, da ein GPR40 Agonist/Antagonist möglicherweise auch hier zum Tragen kämen.

Zukünftig stehen also noch viele *in vivo*-Studien mit pharmakologischen Agonisten und Antagonisten sowie -wenn es sicher erscheint- klinische Studien aus, die deren Einsatz im Rahmen der antidiabetischen Therapie beim Menschen klären müssen. Wichtiger jedoch ist zuvor noch zu untersuchen, ob GPR40 überhaupt beim Menschen die gleiche Bedeutung wie hier beschrieben zukommt.

Literaturverzeichnis

- ADA (American Diabetes Association) 1997. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20, 1183-97.
- Alberti, G., 2004. Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic. The IDF Consensus Workshop. *Diabetes Care* 27, 1798-1811.
- Alberti, K.G., Zimmet, P.Z., 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diab Med* 15, 539-553.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. Zellkommunikation. In: *Molekularbiologie der Zelle*. 4. Auflage. Übersetzt von Jaenicke, L., Arndt, O., Börsch-Haubold, A., Börsch-Supan, M., Burkovski, A., Cramer, M., Grether-Beck, S., Jacoby, P., Jaenicke, T., Kunz, J., Lazar, T., Moreno Borchart, A., Waffenschmidt, S. 2004. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim, 967-1054.
- Amaxa GmbH 2006. Efficient delivery of Dharmacon SMARTpool siRNA reagents in hard-to-transfect cell lines using amaxa NUCLEOFECTOR 96-well Shuttle System. Quelle: www.dharmacon.com/docs/amaxa_tech_note_final_030607.pdf.
- American Diabetes Association 2004. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 27, 5-10.
- Amersham Biosciences 2002. Instructions for DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems. Version 74000004 ED. AE.
- Anderson, J.W., Kendall, C.W., Jenkins, D.J., 2003. Importance of weight management in type 2 diabetes: review with meta-analysis of clinical studies. *J AM Coll Nutr* 22, 331-339.
- Antinozzi, P.A., Segall, L., Prentki, M., McGarry, J.D., Newgard, C.B., 1998. Molecular or pharmacologic perturbation of the link between glucose and lipid

metabolism is without effect on glucose-stimulated insulin secretion: a reevaluation of the long-chain acyl-CoA hypothesis. *J Biol Chem* 273, 16146-16154.

- Antunes, C.M., Salgado, A.P., Rosario, L.M., Santos, R.M., 2000. Differential patterns of glucose-induced electrical activity and intracellular calcium responses in single mouse and rat pancreatic islets. *Diabetes* 49, 2028-2038.
- Arkhammar P., Juntti-Berggren L., Larsson O., Welsh M., Nanberg E., Sjöholm A., Kohler, M., Berggren P.O., 1994. Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function to the β -cell voltage-activated Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 269, 2743-2749.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P.A., Wollheim, C.B., 1992. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130, 167-178.
- Ashcroft, F.M. und Gribble, F.M., 1999. ATP-sensitive K^+ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 42, 903-919.
- Ashcroft, F.M., Proks, P., Smith, P.A., Ämmälä, C., Bokvist, K., Rorsman, P., 1994. Stimulus secretion coupling in pancreatic beta cells. *J. Cell. Biochem.* 55 (Suppl.), 54-65.
- Ashcroft, F.M., Rorsman, P., 1990. ATP-sensitive K^+ channels: a link between B-cell metabolism and insulin secretion. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 109-111.
- Aiyar, N., Baker, E., Wu, H. L., Nambi, P., Edwards, R. M., Trill, J. J., Ellis, C., and Bergsma, D. J., 1994. Human AT1 receptor is a single copy gene: characterization in a stable cell line. *Mol. Cell. Biochem.* 131, 75-86.
- Banerji, M.A., Lebovitz, H.E., 1989. Insulin-sensitive and insulin-resistant variants in NIDDM. *Diabetes* 38. 784-792.
- Barnett, A.H., Eff, C., Leslie, R.D., Pyke, D.A., 1981. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20, 87-93.
- Birnboim, H.C. und Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1522.
- Bishop, A.E., Polak, J.M., 1997. The anatomy, organization and ultrastructure of the islet of Langerhans. In: Pickup, K., Williams, G. (Hrsg.), *Textbook of Diabetes*, Blackwell, Oxford 1997, 6.1-6.16.

- Bokoch, G.M., Katada, T., Northup, J.K., Hewlett, E.L., Gilman, A.G., 1983. Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J Biol Chem* 258, 2072-2075.
- Briscoe, C.P., Peat, A.J., McKeown, S.C., Corbett, D.F., Goetz, A.S., Littleton, T.R., McCoy, D.C., Kenakin, T.P., Andrews, J.L., Ammala, C., Fornwald, J.A., Ignar, D.M., Jenkinson, S., 2006. Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules. *Br J Pharmacol.* 148, 619-628.
- Briscoe, C.P., Tadayon, M., Andrews, J.L., Benson, W.G., Chambers, J.K., Eilert, M.M., Ellis, C., Elshourbagy N.A., Goetz, A.S., Minnick, D.T., Murdock, P.R., Sauls, H.R. Jr., Shabon, U., Spinage, L.D., Strum, J.C., Szekeres, P.G., Tan, K.B., Way, J.M., Ignar, D.M., Wilson, S., Muir, A.I., 2003. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* 278, 11303-11311.
- Bunemann, M., Hosey, M.M. 1999. G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signaling. *J Physiol* 517, 5-23.
- Carey, V.J., Walters, E.E., Colditz, G.A., Salomon, C.G., Willett, W.C., Rosner, B.A., Speizer, F.E., Manson, J.E., 1997. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 145, 614-619.
- Chase, J.F., Tubbs P.K., 1992. Specific inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation by 2-bromopalmitate and its coenzyme A and carnitine esters. *Biochem. J.* 129, 55-65.
- Chen, S., Ogawa A., Ohneda, M., Unger, R.H., Foster, D.W., McGarry, J.D., 1994. More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic beta-cell signaling. *Diabetes* 43, 878-883.
- Cook D.L., Perara E., 1982. Islet electrical pacemaker response to α -adrenergic stimulation. *Diabetes* 31, 985-990.
- Corkey, B.E., Deeney, J.T., Yaney, G.C., Tornheim, K., Prentki, M., 2000. The role of longchain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction. *J. Nutr.* 130 (2S Suppl.), 299S-304S.

- Corkey, B.E., Glennon, M.C., Chen, K.S., Deeney, J.T., Matschinsky, F.M., Prentki, M. 1989. A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 264, 21608-21612.
- Crespin S.R., Greenough, W.B. 3rd, Steinberg, D., 1969: Stimulation of insulin secretion by infusion of free fatty acids. *J. Clin. Invest* 48, 1934-1943.
- Crystal Chem Inc. 2004. Rat Insulin ELISA Kit instruction, Version V.4/Apr./2004.
- Deeney, J.T., Gromada, J., Hoy, M., Olsen, H.L., Rhodes, C.J., Prentki, M., Berggren, P.O., Corkey, B.E., 2000. Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells). *J Biol Chem* 275, 9363-9368.
- DeFronzo, R.A., 1997. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev* 5, 877-894.
- Deutsche Diabetes-Union (DDU) (Hrsg.): Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2004, Kirchheim & C GmbH, Mainz.
- Dharmacon 2004. SMARTpool Reagents Product Insert – Version 2.0.
- Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993. Effect of intensive treatment of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329, 977-986.
- Dobbins, R.L., Chester, M.W., Stevenson, B.E., Daniels, M.B., Stein, D.T., McGarry, J.D., 1998a. A fatty acid-dependent step is critically important for both glucose- and non-glucose-stimulated insulin secretion. *J Clin Invest* 101, 2370-2376.
- Dobbins, R.L., Chester, M.W., Daniels, M.B., McGarry, J.D., Stein, D.T., 1998b. Circulating fatty acids are essential for efficient glucose-stimulated insulin secretion after prolonged fasting in humans. *Diabetes* 47, 1613-1618.
- Docherty, K., Steiner 1997. Molecular and cellular biology of the beta-cell. In: Porte, D., Sherwin, R.S. (Hrsg.) *Ellenberg & Rifkin's Diabetes mellitus*. Appleton & Lange, Stamford, 5th ed., 29-48.
- Doyle, M.E., Egan, J.M. 2003. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev* 55, 105-131.
- Drews 2000. Drug discovery: a historical perspective. *Science* 287, 1960-1964.

- Drewe G., Debuyser A., Nenquin M., Henquin J.C., 1990. Galanin and epinephrine act on distinct receptors to inhibit insulin release by the same mechanisms including an increase in K⁺ permeability of the B-cell membrane. *Endocrinology* 126, 1646-1653.
- Drucker, D.J., 2001. Minireview: the glucagon-like peptides. *Endocrinology* 142, 521-7.
- Dugi, K., Kassessinoff, T., Nawroth, P.P., 1999. Typ-2-Diabetes mellitus und genetische Defekte der β -Zell-Funktion. In: Nawroth, P.P. (Hrsg.), *Kompendium Diabetologie*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 169-268.
- Duttaroy, A., Zimlik, C.L., Gautam, D., Cui, Y., Meras, D., Wess, J., 2004. Muscarinic stimulation of pancreatic insulin and glucagon release is abolished in m3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Diabetes* 53, 1714-1720.
- Ebert, R., Creutzfeldt, W., 1987. Gastrointestinal peptides and insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* 3, 1-26.
- Echeverri, C.J., Beachy, P.A., Baum, B., Boutros, M., Buchholz, F., Chanda, S.K., Downward, J., Ellenberg, J., Fraser, A.G., Hacohen, N., Hahn, W.C., Jackson, A.L., Kiger, A., Linsley, P.S., Lum, L., Ma, Y., Mathey-Prévôt, B., Root, D.E., Sabatini, D.M., Taipale, J., Perrimon, N., Bernards, R., 2006. Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat. Methods*, 3, 777-779.
- El-Assaad, W., Buteau, J., Peyot, M.L., Nolan, C., Roduit, R., Hardy, S., Joly, E., Dbaibo, G., Rosenberg, L., Prentki, M., 2003. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* 144, 4154-4163.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K., Tuschl, T., 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in mammalian cell culture. *Nature* 411, 494-498.

- Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B., Prentki, M., 2000. Glukose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvateCitrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 49, 718-726.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringolds, G.M., Danielsen, M., 1987. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413-7417.
- Feng, D.D., Luo, Z., Roh, S., Hernandez, M., Tawadros, N., Keating, D., Chen, C., 2006. Reduktion in voltage-gated K⁺ currents in primary cultured rat pancreatic b-cells by linoleic acid. *Endocrinology* 147, 674-682.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fujiwara, K., Maekawa, F., Yada, T., 2005. Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca²⁺ signaling in rat islet beta-cells: mediation by phospholipase C- and L-type Ca²⁺ channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 289, E670-E677.
- Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., 2004. Desensitization of G Protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 27, 107-144.
- Garrido, D.M., Corbett, D.F., Dwornik, K.A., Goetz, A.S., Littleton, T.R., McKeown, S.C., Mills, W.Y., Smalley, T.L., Briscoe, C.P., Peat, A.J., 2006. Synthesis and activity of small molecule GPR40 agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 1840-1845.
- Gilon, P., Henquin, J.C., 2001. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic β -cell function. *Endocr Rev* 22, 565-604.
- Gilon, P., Henquin, J.C., 1992. Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca²⁺ concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic β -cell. *J Biol Chem*, 267, 20713-20720.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russel, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74.

- Grant, S.F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Maloulescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Steffansson, H., Emilsson, V., Helgadottir, A., Styrkarsdottir, U., Magnusson, K.P., Walters, G.B., Palsdottir, E., Jonsdottir, T., et al. 2006. Variant of transcription factor 7-like 2 (tcf7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38, 320-323.
- Gravena, C., Mathias, P.C., Ashcroft, S.J.H., 2002. Acute effects from fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *Journal of Endocrinology* 173, 73-80.
- Gromada, J., Holst, J.J., Rorsman, P., 1998. Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Pflugers Arch* 435, 583-594.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
- Haber, E.P., Procópio, J., Carvalho, C.R.O., Carpinelli, A.R., Newsholme, P., Curi, R. 2006. New insights into fatty acid modulation of pancreatic β -cell function. *Int Rev Cytol* 248, 1-41.
- Haga, H., Yamada, R., Ohnishi, Y., Nakamura, Y., Tanaka, T., 2002. Gene-based SNP discovery as part of the Japanese millenium genome project: identification of 190,562 genetic variations in the human genome. Single-nucleotide polymorphism. *J Hum Genet* 47, 605-610.
- Hamid, Y.H., Vissingt, H., Holst, B., Urhammer, S.A., Pyke, C., Hansen, S.K., Glümer, C., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Schwartz, T.W., Pedersen, O., Hansen, T., 2005. Studies of relationship between variation of the human G Protein-coupled receptor 40 Gene and Type 2 diabetes and insulin release. *Diabet Med* 22, 74-80.
- Hamilton, J.A., Kamp, F., 1999. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 48, 2255-2269.
- Hammond, S.M., Caudy, A.A., Hannon, G.J., 2001. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* 2, 110-119.

- Hardy, S., St-Onge, G.G., Joly, E., Langelier, Y., Prentki, M., 2005. Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *J Biol Chem* 280, 13285-13291.
- Hardy, S., El-Assaad, W., Przybytkowski, E., Joly, E., Prentki, M., Langelier, Y., 2003. Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *J Biol Chem* 278, 31861-31870.
- Hauner, H., 2006. Diabetesepidemie und Dunkelziffer. In: *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2007. Die Bestandsaufnahme. Vorgelegt von der Deutschen Diabetes-Union (Hrsg.) zum Weltdiabetestag im November 2006.*
- Hausdorff, W.P., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., 1990. Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J* 4, 2881-2889.
- Hedekov, C.J., 1980. Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol Rev* 60, 442-509.
- Hellman, B., Petersson, H., Hellerström C., 1964. The growth pattern of the endocrine pancreas in mammals. In: *Structure and metabolism of the pancreatic islets*, Brodin S, Hellman B und Knutson H, Pergamon, Oxford, 45-60.
- Henquin, J.C., 2004. Pathways in β -cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. *Diabetes* 53, S24-S58.
- Henquin, J.C., Ravier, M.A., Nenquin, M., Jonas, J.C., Gilon, P., 2003. Hierarchy of the β -cell signals controlling insulin secretion. *European Journal of Clinical Investigation*, 33, 742-750.
- Henquin, J.C., 2000. The triggering and amplifying pathways of the regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751-60.
- Hirawata, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., Tsujimoto, G., 2005. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat. Med.* 11, 90-94.
- Hohmeier, H.E., Newgard, C.B., 2004. Cell lines derived from pancreatic islets. *Mol. Cell. Endocrinol.* 228, 121-128.

- Hohmeier, H.E., Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M., Newgard, C.B., 2000. Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49, 424-430.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7276-7280.
- Holz, G.G., 2004. Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic β -cell. *Diabetes* 53, 5-13.
- Holz, G.G., Leech, C.A., Habener, J.F. 1995. Activation of a cAMP-regulated Ca(2+)-signaling pathway in pancreatic β -cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. *J Biol Chem* 270, 17749-17757.
- Invitrogen 2004. Lipofectamine 2000 Description, Transfection Procedure for DNA. Rev. Date: 09. July 2004.
- Invitrogen 2002. Transfecting siRNA into Mammalian Cells using Lipofectamine 2000. Doc Rev. 102802.
- Islam, M.S., Larsson, O., Nilsson, T., Berggren, P.O. 1995. Effects of caffeine on cytoplasmic free Ca²⁺ concentration in pancreatic beta-cells are mediated by interaction with ATP-sensitive K⁺ channels and L-type voltage-gated Ca²⁺ channels but not the ryanodine receptor. *Biochem J* 306, 679-686.
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., Hinuma, S., Fujisawa, Y., Fujino, M., 2003. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422, 173-176.
- Jones, P.M. Persaud, S.J., 1998. Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Endocrine Rev* 19, 429-461.

- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 1996. Histologie. Übersetzt, überarbeitet und ergänzt von Schiebler, T.H., 4. korrigierte und aktualisierte Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 521-530.
- Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M., 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840- 846.
- Kahn, B.B., 1998. Type 2 diabetes: when insulin secretion falls to compensate for insulin resistance. *Cell* 92, 593-596.
- Kapellen, T.M., Galler, A., Böttner, A., Kiess, W., 2004. Epidemiologie, Behandlungsstrategie und Prävention von Typ 2-Diabetes bei Kindern und Jugendlichen. *Dtsch Med Wochenschr* 129, 1519-1523.
- Kasuga, M., 2006. Insulin resistance and pancreatic β cell failure. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 1756-1760.
- Kelly, B.A., Bond, B.C., Poston, L., 2003. Gestational profile of matrix metalloproteinases in rat uterine artery. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 351-358.
- Kerner, W., Fuchs, C., Redaelli, M., Boehm, B.O., Köbberling, J., Scherbaum, W.A., Tillil, H., 2004. Aktualisierung 10/2004 der 1. Auflage vom Juli 2001: Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. In: Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG: Scherbaum, W.A., Lauterbach, K.W., Joost, H.G. (Hrsg.). 1. Auflage. Deutsche Diabetes-Gesellschaft 2001.
- Kieffer, T.J., 2004. Gastro-intestinal hormones GIP and GLP-1. *Ann Endocrinol (Paris)* 65, 13-21.
- Kotarsky, K., Nilsson, N.E., Flodgren, E., Owman, C., Olde, B., 2003. A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 406-410.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C. et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Natur* 409, 860-921.
- Latour, M.G., Alquier, T., Oseid, E., Tremblay, C., Jetton, T.L., Luo, J., Lin, D. C.-H., Poitout, V., 2007. GPR40 is necessary but not sufficient for fatty-acid stimulation of insulin secretion *in vivo*. *Diabetes* 56, 1087-1094.
- Lee, D.K., George, S.R., O'Dowd B.F., 2003. Continued discovery of ligands for G protein-coupled receptors. *Life Sci* 74, 293-297.

- Lee, B., Yang, C., Chen, T.H., al-Azawi, N., Hsu, W.H. 1995. Effect of AVP and oxytocin on insulin release: involvement of V1b receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 269, E1095-E1100.
- Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J.H., McGarry, J.D., Unger, R.H., 1994. Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10878-10882.
- Lee, L.G., Connell, C.R., Bloch, W., 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl Acids Res* 21, 3761-3766.
- Lenz, J.C., Reusch, H.P., Albrecht, N., Schultz, G., Schaefer, M., 2002. Ca²⁺ controlled competitive diacylglycerol binding of protein kinase C isoenzymes in living cells. *J Cell Biol* 159, 291-301.
- Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M.A., Guillaume, J.L., Jockers, R., 2006. Do orphan G-protein –coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Rep.* 7, 1094-1098.
- Liebermeister, H., 2006. Lifestyle-Faktoren – treibende Kraft einer Epidemie. In: *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2006*. Deutsche Diabetes-Union (Hrsg.), Kirchheim-Verlag, Mainz.
- Liebermeister, H., 2005. Prevention of obesity and lipid disorders in: *Prevention of type 2 diabetes*. Ganz, M. (Hrsg.) John Wiley and sons Ltd., London 2005, 203-243.
- Lillioja, S., Mott, D.M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J.E., Ravussin, E, Knowler, W.C., Bennett, P.H., Bogardus, C., 1993. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med* 329. 1988-1992.
- Lin, S.H., Civelli, O., 2004. Orphan G protein coupled receptors: targets for new therapeutic interventions. *Ann Med* 36, 204-214.
- Lingohr, M.K., Buettner, R., Rhodes, C.J., 2002. Pancreatic beta-cell growth and survival-a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trands Mol Med* 8, 375-384.
- Livak, K.J. und Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods.* 25, 402-408.

- Luttrell, L.M., 2006. Transmembrane signaling by G-protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol* 332, 3-49.
- Ma, Y.H., Wang, J., Rodd, G.G., Bolaffi, J.L., Grodsky, G.M., 1995. Differences in insulin secretion between the rat and mouse: role of cAMP. *Eur J Endocrinol* 132, 370-376.
- Malaisse, W.J., 1996. Metabolic signaling of insulin secretion. *Diabetes Rev* 4, 145-59.
- Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Kawazu, S., Herchulez, A., Valverde, I., Sener, A., 1979. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. The links between metabolic and cationic events. *Diabetologia* 16, 331-341.
- Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., 1968. Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites. *J Lab Clin Met* 72, 438-448.
- Martin, B.C., Warram, J.H., Krolewski, A.S., Bergman, R.N., Soeldner, J.S., Kahn, C.R., 1992. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year-follow-up study. *Lancet* 340, 925-929.
- Matschinsky, F.M., 1996. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45, 223-241.
- McGarry, J.D., 2002. Banting Lecture 2001: Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 7-18.
- Mears, D., 2004. Topical review: Regulation of insulin secretion in islets of langerhans by Ca²⁺ channels. *J Membrane Biol* 200, 57-66.
- Meissner, T., Beinbrech, B., Mayatepek, E., 1999. Congenital hyperinsulinism: molecular basis of a heterogeneous disease. *Hum Mutat* 13, 351-61.
- Meng, E.C., Bourne, H.R., 2001. Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? *Trends Pharmacol Sci* 22, 587-593.
- Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C.B., Maechler, P., 2004. Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology* 145, 667-678.
- Moller, D.E., Kaufmann, K.D., 2005. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med* 56, 45-62.

- Mulder, H., Lu, D., Finley, J.T., An, J., Cohen, J., Antinozzi, P.A., McGarry, J.D., Newgard, C.B., 2001. Overexpression of a modified human malonyl-CoA decarboxylase blocks the glucose-induced increase in malonyl-CoA level but has no impact on insulin secretion in INS-1 derived (832/13) beta-cells. *J Biol Chem* 276, 6479-6484.
- Newgard, C.B., McGarry, J.D., 1995. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 64, 689-719.
- Newman, B., Selby, J.V., King, M.C., Slemenda, C., Fabsitz, R., Friedman, G.D., 1987. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 30, 763-768.
- Nilsson T., Arkhammar P., Rorsman P., Berggren P.O., 1988. Inhibition of glucose-stimulated insulin release by α_2 -adrenoceptor activation is paralleled by both a repolarization and a reduction in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration. *J Biol Chem* 263, 1855-1860.
- Nolan, C., Madiraju, M.S.R., Delghingaro-Augusto, V., Peyot, M.-L., Prentki, M. 2006. Fatty acid signaling in the b-cell and insulin secretion. *Diabetes* 55, S16-S23.
- Ogawa, T., Hirose, H., Miyshita, K., Saito, I., Saruta, T., 2005. GPR40 gene Arg211His polymorphism may contribute to the variation of insulin secretory capacity in Japanese men. *Metabolism* 54, 296-299.
- Oh da, Y., Kim, K., Kwon, H.B., Seong, J.Y., 2006. Cellular and molecular biology of orphan G protein-coupled receptors. *Int Rev Cytol* 252, 163-218.
- Oshikawa, S., Tanoue, A., Koshimizu, T.A., Kitagawa, Y., Tsujimoto, G., 2004. Vasopressin stimulates insulin release from islets cells through V1b receptors: a combined pharmacological/knockout approach. *Mol Pharmacol* 65, 623-629.
- Palitzsch, K.-D, Bollheimer, C., 2000. Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2. In: Böhm, B.O., Palitzsch, K.-D., Rosak, C., Spinass, G.A. (Hrsg.). *Klinische Diabetologie*. Springer Verlag Berlin, 31-48.
- Paolisso, G., Tataranni, P.A., Foley, J.E., Bogardus, C., Howard, B.V., Ravussin, E., 1995. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 38, 1213-1217.

- Parker, S.M., Moore, P.C., Johnson, L.M., Poitout, V., 2003. Palmitate potentiation of glucose-induced insulin release: a study using 2-bromopalmitate. *Metabolism* 52, 1367-1371.
- Pfaffl, M.W., 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1, 92-95.
- Pfanner, N., Orci, L., Glick, B.S., Amherdt, M., Arden, S.R., Malhotra, V., Rothman, J.E., 1989. Fatty acyl-coenzyme A is required for budding of transport vesicles from golgi cisternae. *Cell* 59, 95-102.
- Pfeiffer, A.F.H., 2000. Typ 2-Diabetes mellitus: ein mismatch von Umwelt und Anlage. In: Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke Jahresbericht 1999-2000, 14-19, Deutsches Institut für Ernährungsforschung (Hrsg.), BKB Verlag, Köln.
- Poitout, V., Hagman, D., Stein, R., Artner, I., Robertson, R.P., Harmon, J.S., 2006. Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr* 136, 873-876.
- Poitout, V., 2003. The ins and outs of fatty acid on the pancreatic β -cell. *Trends Endocrinol Metab* 14, 201-203.
- Polak, J.M., Ghatge, M.A., Wharton, J., Bishop, A.E., Bloom, S.R., Solcia, E., Brown, M.R., Pearse, A.G.E., 1978. Bombesin-like immunoreactivity in the gastrointestinal tract, lung and central nervous system. *Scand J Gastroenterol* 19 (Suppl 49), 148.
- Polonsky, K.S., Sturis, J., Bell, G.I., 1996. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus – a genetically failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 334, 777-783.
- Pierce, K.L., Premont, R.T., Lefkowitz, R.J., 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 639-650.
- Piiper, A., Stryjek-Kaminska, D., Klengel, R., Zeuzem, S., 1997. CCK, carbachol, and bombesin activate distinct PLC-beta-isoenzymes via Gq/11 in rat pancreatic acinar membranes. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 272, G135-G140.

- Praz, G.A., Halban, P.A., Wollheim, C.B., Blondel, B., Strauss, A.J., Renold, A.E. 1983. Regulation of immunoreactive insulin from a rat cell line (RINm5F). *Biochem J* 210, 325-352.
- Prentki, M., Nolan, C.J., 2006. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116, 1802-1812.
- Prentki, M., Joly, E., El-Assad, W., Roduit, R., 2002. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: a role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51 (Suppl 3), S405-S413.
- Prentki, M., Tornheim, K., Corkey, B.E., 1997. Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* 40 (Suppl. 2), S32-S41.
- Prentki, M., 1996. New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol* 134, 272-286.
- QIAGEN 2006. QIAprep Miniprep Handbook, 2nd Edition (December 2006).
- Rana, B.K., Shiina, T., Insel, P.A., 2001. Genetic variations and polymorphisms of G protein-coupled receptors: functional and therapeutic implications. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 41, 593-624.
- QIAGEN 2003. RNAiFect Transfection Handbook for transfection of eukaryotic cells with siRNA (10/2003).
- QIAGEN 2002. RNeasy Mini Handbuch (04/2002).
- Randle, P.J., 1998. Regulatory interactions between the lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 14, 263-283.
- Rayasam, G.V., Tulasi, V.K., Davis, J.A., Bansal, V.S., 2007. Expert Opinion: Fatty acid receptors as new therapeutic targets for diabetes. *Expert Opin Ther Targets* 11, 661-671.
- Remizov, O., Jakubov, R., Düfer, M., Krippeit Drews, P., Drews, G., Waring, M., Brabant, G., Wienbergen, A., Rustenbeck, I., Schöfl, C., 2003. Palmitate-induced Ca^{2+} -signaling in pancreatic beta-cells. *Mol Cell Endocrinol* 212, 1-9.
- Richieri, G.V., Kleinfeld, A.M., 1995. Unbound free fatty acid levels in human serum. *J Lipid Res* 36, 229-240.
- Richieri, G.V., Anel, A., Kleinfeld, A.M., 1993. Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry* 32, 7574-7580.

- Richieri, G.V., Ogata, R.T., Kleinfeld, A.M., 1992. A fluorescently labeled intestinal fatty acid binding protein. Interactions with fatty acids and its use in monitoring free fatty acids. *J Biochem* 267, 23495-23501.
- Robert Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt 2005. Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Heft 24 – Diabetes mellitus. Berlin im März 2005.
- Robertson R.P., Seaquist E.R., Walseth T.F., 1991. G proteins and modulation of insulin secretion. *Diabetes* 40, 1-6.
- Roche 2000. FuGENE 6 Transfection Reagent Instruction Manual. Version 5, (09/2000).
- Roduit, R., Nolan, C., Alarcon, C., Moore, P., Barbeau, A., Delghingaro-Augusto, V., Przybykowski, E., Morin, J., Masse, F., Massie, B., Ruderman, N., Rhodes, C., Poitout, V., Prentki, M., 2004. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* 53, 1007-1019.
- Rorsman, P., 1997. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia*, 40, 487-495.
- Rösen, P., 1999. Physiologische Glukoseregulation. In: Nawroth, P.P. (Hrsg.), *Kompendium Diabetologie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 4 – 31.
- Ross, J., 1995. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 59, 423-450.
- Rychlik, W., Rhoads, R.E., 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridisation, sequencing and for in vitro amplification of DNA. *Nucl Acids Res* 17, 8543.
- Saifer, A. und Goldman, L. 1961. The free fatty acids bound to human serum albumin. *J Lipid Res* 2, 268-270.
- Salehi, A., Flodgren, E., Nilsson, N.E., Jimenez-Feltstom, J., Miyazaki, J., Owman, C., Olde, B., 2005. Free fatty acid receptor 1 (FFA(1) R/GPR40) and its involvement in fatty-acidstimulated insulin secretion. *Cell Tissue Res* 322, 207-215.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* 75, 5463-5467.

- Sawzdargo, M., George, S.R., Nguyen, T., Shikie, X., Kolakowski, L.F. Jr., O'Dowd, B.F., 1997. A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 543-547.
- Schlyer, S., Horuk, R., 2006. I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development. *Drug Discov Today* 11, 481-493.
- Schöfl, C., Börger, J., Lange, S., von zur Mühlen, A., Brabant, G., 2000a. Energetic requirement of carbachol-induced Ca^{2+} signaling in single mouse β -cells. *Endocrinology* 141, 4065-4071.
- Schöfl, C., Börger, J., Mader, T., Waring, M., von zur Mühlen, A., Brabant, G., 2000b. Tolbutamide and diazoxide modulate phospholipase C-linked Ca^{2+} signaling and insulin secretion in β -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278, E639-E647.
- Schöfl, C., Rössig, L., Mader, T., von zur Mühlen, A., Brabant, G., 1996a. Cyclic Adenosine 3', 5-monophosphate potentiates Ca^{2+} signaling and insulin secretion by phospholipase C-linked hormones in HIT cells. *Endocrinology* 137, 3026-3032.
- Schöfl, C., Rössig, L., Leitholf, H., Mader, T., von zur Mühlen, A., Brabant, G., 1996b. Generation of repetitive Ca^{2+} transients by bombesin requires intracellular release and influx of Ca^{2+} through voltage dependent and voltage independent channels in single HIT cells. *Cell Calcium* 19, 485-493.
- Schöfl, C., Schulte, P., Rössig, L., von zur Mühlen, A., Brabant, G., 1995. Vasopressin induces frequency-modulated repetitive calcium transients in single insulin secreting HIT cells. *Mol Cell Endocrinol* 108, 185-192.
- Schrimpf, G. (Hrsg.) 2002. *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 3. Auflage, S. 2, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin.
- Sekine, N., Fasolato, C., Pralong, W.F., Theler J.M., Wollheim, C.B., 1997. Glukose-induced insulin secretion in INS-1 cells depends on factors present in fetal calf serum and rat islet-conditioned medium. *Diabetes* 46, 1424-1433.
- Seyffert Jr, W.A., Madison, L.L., 1967. Physiologic effects of metabolic fuels on carbohydrate metabolism. I. Acute effect of elevation of plasma free fatty

- acids on hepatic glucose output, peripheral glucose utilization, serum insulin, and plasma glucagon levels. *Diabetes* 16, 765-776.
- Shapiro, H., Shachar, S., Sekler, I., Hershfinkel, M., Walker, M.D., 2005. Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 97-104.
- Sharp, G.W., 1979. The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of Langerhans and its role in the control of insulin release. *Diabetologia* 16, 287-296.
- Sigma 2005. GenElute HP Plasmid Gigaprep Kit. User Guide. (Genelute HP Plasmid Midiprep NA0200).
- Small, K.M., McGraw, D.W., Liggett, S.B., 2003. Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 381-411.
- Song, F., Lu, S., Gunnet, J., Xu, J.Z., Wines, P., Proost, J., Liang, Y., Baumann, C., Lenhard, J., Murray, W.V., Demarest, K.T., Kuo, G.H., 2007. Synthesis and biological evaluation of 3-Aryl-3-(4-phenoxy)-propionic acid as a novel series of G protein-coupled receptor 40 agonist. *J Med Chem* 50, 2807-2817.
- Spector, A.A., Fletcher, J.E., 1978. Transport of fatty acid in the circulation. In: *Disturbances in lipid and lipoprotein metabolism*. Dietschy, J.A.M., Ontko, A., (Hrsg.), American Physiological Society, Bethesda, MD., 229-249.
- Spector, A.A., 1975. Fatty acid binding to plasma albumin. *J Lipid Res* 16, 165-179.
- Spector, A.A., Fletcher, J.E., Ashbrook, J.D., 1971. Analysis of long-chain free fatty acid binding to bovine serum albumin by determination of stepwise equilibrium constants. *Biochemistry* 10, 3229-3232.
- Spiegel, A. 2006. Mutations in G proteins and G protein-coupled receptors in human endocrine diseases. In: Conn, M., Kordon, C., Christen, Y. (eds.). *Insights into receptor function and new drug development targets*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 139-150.
- Spiegel, A.M., Weinstein, L.S. 2005. Inherited diseases involving G proteins and G protein-coupled receptors. *Annu Rev Med* 55, 27-39.

- Spiegel, A.M., 1998. Introduction to G-protein-coupled signal transduction and human disease. In: Spiegel, A.M. (ed.). *G Proteins, Receptors, and Disease*. Humana Press, 1-21.
- Spinas, G.A., Lehmann, R., 2001. Der Diabetes mellitus: Diagnose, Klassifikation und Pathogenese. *Schweiz Med Forum* 20, 519-525.
- Spinas, G.A., 2000. Pathogenese des Typ 1 Diabetes. In: Böhm, B.O., Palitzsch, K.-D., Rosak, C., Spinas, G.A. (Hrsg.). *Klinische Diabetologie*. Springer Verlag Berlin, 13-24.
- Stein, D.T., Esser, V., Stevenson, B.E., Lane, K.E., Whiteside, J.H., Daniels, M.B., Chen, S., McGarry, J.D., 1996. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest* 97, 2728-2735.
- Steneberg, P., Rubins, N., Bartoov-Shifman, R., Walker, M.D., Edlund, H., 2005. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metabolism* 1, 245-258.
- Stoddart, L.A., Brown, A.J., Milligan, G., 2007. Uncovering the pharmacology of the G protein-coupled receptor GPR40: high apparent constitutive activity in guanosine 5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding studies reflects binding of an endogenous agonist. *Mol Pharmacol* 71, 994-1005.
- Stratagene 2004. *Brilliant QPCR Master Mix* Instruction Manual. Revision No. 044001d.
- Stratagene 2003. *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* Instruction Manual. Revision No. 0530081.
- Straub, G.W., Sharp, G.W., 1996. Glukose-dependent insulinotropic polypeptide stimulates insulin secretion via increased cyclic AMP and $[Ca^{2+}]_i$ and a wortmannin-sensitive signalling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 369-374.
- Stryer, L., 1999. Die Koordination des Stoffwechsels. In: *Biochemie*. Aus dem Englischen übersetzt von Stoll, G., Pfeiffer, B., Guglielmi, J., 1. korrigierter Nachdruck 1999 der 4. Auflage 1996. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 803-824.

- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D., Herman, B., 1999. Measurement of Intracellular Calcium. *Physiological Reviews* 79, 1089-1125.
- Thompson, M.D., Burnham, W.M., Cole, D.E., 2005. The G-protein-coupled receptors: pharmacogenetics and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 42, 311-392.
- Teifel, M., 2007. Transfektion von Säugerzellen. In: *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor von Jahnsen, M. (Hrsg.), 4. Auflage, S. 283 ff., Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg.*
- Teller, D.C., Okada, T., Behnke, C.A., Palczewski, K., Stenkamp, R.E., 2001. Advances in determination of a high-resolution three-dimensional structure of rhodopsin, a model of G-protein-coupled receptors (GPCRs). *Biochemistry* 40, 7761-7772.
- Tomita, T., Masuzaki, H., Iwakura, H., Fujikura, J., Noguchi, M., Tanaka, T., Ebihara, K., Kawamura, J., Komoto, I., Kawaguchi, Y., Fujimoto, K., Doi, R., Shimada, Y., Hosoda, K., Imamura, M., Nakao, K. 2006. Expression of the gene for a membrane-bound fatty acid receptor in the pancreas and islet cell tumors in humans: evidence for GPR40 expression in pancreatic beta cells and implications for insulin secretion. *Diabetologia* 49, 962-968.
- Tomita, T., Masuzaki, H., Noguchi, M., Iwakura, H., Fujikura, J., Tanaka, T., Ebihara, K., Kawamura, J., Komoto, I., Kawaguchi, Y., Fujimoto, K., Doi, R., Shimada, Y., Hosoda, K., Imamura, M., Nakao, K. 2005. GPR40 gene expression in human pancreas and insulinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1788-1790.
- UK Prospective Diabetes Study GROUP 1998. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 325, 837-853.
- Varga, G., Adrian, T.E., Coy, D.H., Reidelberger, R.D., 1994. Bombesin receptor subtype mediation of gastroenteropancreatic hormone secretion in rats. *Peptides* 15, 713-718.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291, 1303-1351.

- Wabitsch, M., Hauner, H., Hertrampf, M., Mach, R., Hay, B., Mayer, H., Debatin, K.-M., Heinze, E., 2004. Type 2 diabetes mellitus and impaired glucose regulation in German children and adolescents with obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 307-313.
- Wagenknecht, L.E., Langefeld, C.D., Scherzinger, A.L., Norris, J.M., Haffner, S.M., Saad, M.F., Bergmann, R.N., 2003. Insulin sensitivity, insulin secretion, and abdominal fat: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Family Study. *Diabetes* 52, 2490-2496.
- Warnotte, C., Nenquin, M., Henquin, J.C., 1999. Unbound rather than total concentration and saturation rather than unsaturation determine the potency of fatty acids on insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 153, 147-153.
- Warnotte, C., Gilon, P., Nenquin, M., Henquin, J.C., 1994. Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells. *Diabetes* 43, 703-711.
- Wettschurek, N., Offermanns, S., 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85, 1159-1204.
- Wise, A., Jupe, S.C., Rees, S., 2004. The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 43-66.
- Yaney, G.C., Corkey, B.E., 2003. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1297-1312.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Bartel, D.P., 2000. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* Vol 101, 25-33.
- Zawalich, W.S., 1996. Regulation of insulin secretion by phosphoinositide-specific phospholipase C and protein kinase C activation. *Diabetes Rev* 4, 160-167.
- Zimmet, P., Alberti, K.G., Shaw, J., 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.

Anhang

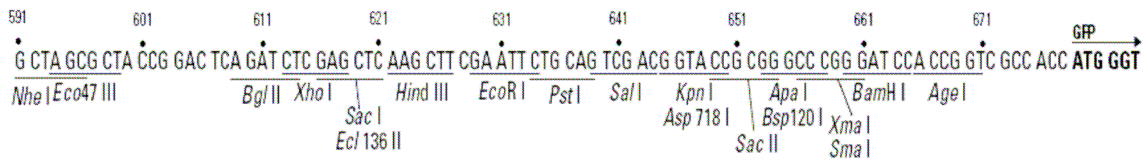
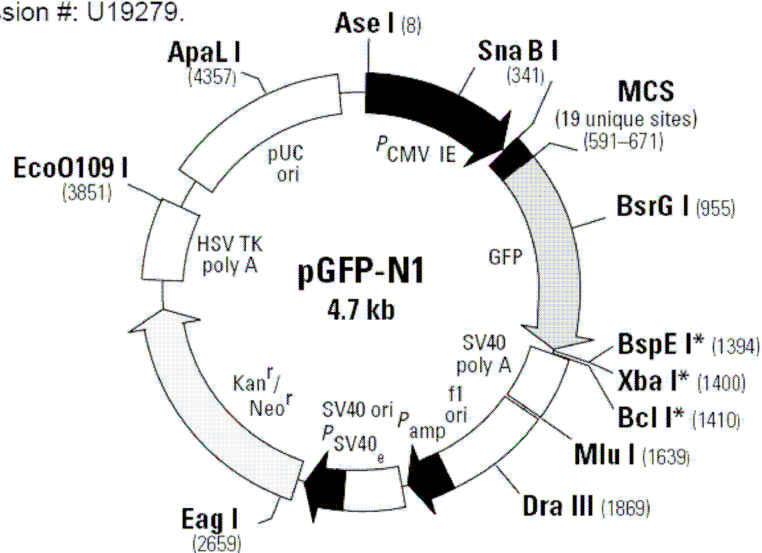
8.1 Plasmidinformation zu pGFP-N1

pGFP-N1 Vector Information

PT2032-5

This vector information is no longer available from CLONTECH; however, we will still provide this information as a courtesy.

GenBank Accession #: U19279.



Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pGFP-N1. Unique restriction sites are in bold.

RESTRICTION MAP OF pGFP-N1 (Unique restriction sites are in bold). The *BspE* I, *Xba* I, and *Bcl* I sites* are methylated in the DNA provided by CLONTECH. If you wish to digest the vector with these enzymes, you will have to transform the vector into a *dam*⁻ host and make fresh DNA.

Description:

The MCS in pGFP-N1 is between the immediate early promoter of CMV (P_{CMVIE}) and the GFP coding sequences. Genes cloned into the MCS will be expressed as fusions to the N-terminus of GFP if they are in the same reading frame as GFP and there are no intervening stop codons. (The two alternative reading frames are available in pGFP-N2 and pGFP-N). SV40 polyadenylation signals downstream of the GFP gene direct proper processing of the 3' end of the GFP mRNA. The vector backbone also contains an SV40 origin for replication in mammalian cells expressing the SV40 T antigen. A neomycin-resistance cassette (*neo*^R), consisting of the SV40 early promoter, the neomycin/kanamycin resistance gene of Tn5, and polyadenylation signals from the Herpes simplex thymidine kinase gene, allows stably transfected eukaryotic cells to be selected using G418. A bacterial promoter upstream of this cassette (P_{amp}) expresses kanamycin resistance in *E. coli*. The pGFP-N1 backbone also provides a pUC19 origin of replication for propagation in *E. coli* and an f1 origin for single stranded DNA production.

USE:

Fusions to the N-terminus of GFP retain the fluorescent properties of the native protein (3, 4) allowing the localization of the fusion protein *in vivo* (4). The target gene should be cloned into pGFP-N1 so that it is in frame with the GFP coding sequences, with no intervening in-frame stop codons. The inserted gene should include the initiating ATG codon. The recombinant GFP vector can be transfected into mammalian cells using one of the standard transfection methods, e.g. calcium phosphate precipitation (5), electroporation (5), and cationic liposomes (6). If required, stable transformants can be selected using G418 (7).

Location of features

- Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter: 1–589
 - Enhancer region: 59–465
 - TATA box: 554–560
 - Transcription start point: 583
- MCS: 591–671
- Green fluorescent protein gene
 - Start codon (ATG): 679–681; Stop codon: 1405–1407
 - GFP fluorescent chromophore: 871–879
 - Last amino acid in wild-type GFP: 1390–1392
- SV40 early mRNA polyadenylation signal
 - Polyadenylation signals: 1547–1552 & 1576–1581
 - mRNA 3' ends: 1585 & 1597
- f1 single-strand DNA origin: 1644–2099
- Ampicillin resistance (β -lactamase) promoter
 - 35 region: 2161–2166; –10 region: 2184–2189
 - Transcription start point: 2196
- SV40 origin of replication: 2440–2575
- SV40 early promoter
 - Enhancer (72-bp tandem repeats): 2273–2344 & 2345–2416
 - 21-bp repeats: 2420–2440, 2441–2461, & 2463–2483
 - Early promoter element: 2496–2502
 - Major transcription start points: 2492, 2530, 2536 & 2541
- Kanamycin/neomycin resistance gene
 - Neomycin phosphotransferase coding sequences:
 - Start codon (ATG): 2624–2626; stop codon: 3416–3418
- Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signal
 - Polyadenylation signals: 3654–3659 & 3667–3672
- pUC plasmid replication origin: 4003–4646

Propagation in *E. coli*

- Suitable host strains: DH5 α , HB101 and other general purpose strains.
- Selectable marker: plasmid confers resistance to kanamycin (30 μ g/ml) to *E. coli* hosts.
- *E. coli* replication origin: pUC
- Copy number: \approx 500
- Plasmid incompatibility group: pMB1/ColE1

REFERENCES

1. Frasher, D.C. *et al.* (1992) *Gene* 111:229–233.
2. Chalfie, M. *et al.* (1994) *Science* 263:802–805.
3. Inouye, S. & Tsuji, F.I. (1994) *FEBS Letters* 341:277–280.
4. Wang, S. & Hazelrigg, T. (1994) *Nature* 369:400–403.
5. Sambrook, J. *et al.* (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor Press, N.Y.
6. Felgner, P.L. (1991) *Methods in Molecular Biology* 7:81–89.
7. Gorman, C. (1985). In *DNA cloning: a practical approach*, vol. II. Ed. D.M. Glover. IRL Press, Oxford, U.K. p143–190.

Note: The attached sequence file has been compiled from information in the sequence databases, published literature, and other sources, together with partial sequences obtained by CLONTECH. This vector has not been completely sequenced.

8.2 Ausnahmegenehmigung für die Tötung von Mäusen

Aufgrund des Antrages vom 26.02.2004 erteile ich gem. § 9 Abs.1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes vom 25.05.1998 (BGBl. I S. 1105) in der zur Zeit geltenden Fassung

der

**Diplom-Ökotoxikologin
Frau Susanne Schnell**

unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs die Erlaubnis,

**unter Anleitung und Aufsicht folgende/n nichtoperative/n Eingriff/e und
Behandlung/en durchzuführen:
Tötung von Mäusen durch cervikale Dislokation nach Betäubung**

Diese Ausnahmegenehmigung wird erteilt für die Zeit

vom 23.03.2004 bis zum 22.03.2009

und für Ihre Tätigkeit bei folgender Einrichtung:

Medizinische Hochschule Hannover
Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
30625 Hannover

Ich weise darauf hin, dass eine Änderung der Beteiligung oder Verantwortlichkeit eine Änderung der Ausnahmegenehmigung erfordert. Nach mindestens vierwöchiger Einweisung und nach Begutachtung durch mich kann eine geänderte Ausnahmegenehmigung erteilt werden. Ich bitte diesbezüglich ggf. um Terminabsprache.

Hannover, den 07.05.2004

Im Auftrage

Dr. Schaefer
Dr. Schaefer



8.3 Tabelle 1 aus Itoh et al. 2003

Table 1 **Fatty acid potency to induce $[Ca^{2+}]_i$ rise in CHO cells expressing GPR40**

FFA	(EC ₅₀ , μ M)		
	Human	Mouse	Rat
Acetic acid (C2)	Inactive	Inactive	Inactive
Butyric acid (C4)	Inactive	Inactive	Inactive
Caproic acid (C6)	Inactive	Inactive	>300
Caprylic acid (C8)	>300	Inactive	>300
Capric acid (C10)	43 \pm 2.2	>100	>100
Lauric acid (C12)	5.7 \pm 1.4	5.6 \pm 1.6	13 \pm 3.3
Myristic acid (C14)	7.7 \pm 1.4	6.0 \pm 0.8	7.3 \pm 0.5
Palmitic acid (C16)	6.8 \pm 0.5	4.6 \pm 1.2	6.6 \pm 0.4
Stearic acid (C18)	>300	>300	>300
Oleic acid (C18:1)	2.0 \pm 0.3	2.7 \pm 0.5	3.4 \pm 0.4
Elaidic acid (C18:1)	4.7 \pm 0.4	6.5 \pm 1.5	11 \pm 1.5
Linoleic acid (C18:2)	1.8 \pm 0.1	2.9 \pm 0.3	4.1 \pm 0.5
Methyl linoleate	Inactive	Inactive	Inactive
α -Linolenic acid (C18:3)	2.0 \pm 0.3	3.6 \pm 0.3	4.0 \pm 0.7
γ -Linolenic acid (C18:3)	4.6 \pm 1.6	5.2 \pm 0.6	5.4 \pm 1.1
Arachidonic acid (C20:4)	2.4 \pm 0.6	5.4 \pm 0.8	8.0 \pm 0.6
Eicosapentaenoic acid (C20:5)	2.3 \pm 0.4	4.9 \pm 0.8	9.8 \pm 0.6
Docosahexaenoic acid (C22:6)	1.1 \pm 0.3	16 \pm 4.7	13 \pm 1.7
5,6-Epoxyeicosatrienoic acid	7.7 \pm 0.2	ND	ND
8,9-Epoxyeicosatrienoic acid	6.1 \pm 0.2	ND	ND
11,12-Epoxyeicosatrienoic acid	1.4 \pm 0.3	ND	ND
14,15-Dihydroxyeicosatrienoic acid	1.1 \pm 0.4	ND	ND

EC₅₀ indicates the concentration of a sample that produces 50% of the maximal response, and was calculated from dose-response curves. Data represent the mean values \pm s.e.m. in 3–6 assays. Inactive, no response at 300 μ M; ND, not done.

Quelle: Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., Hinuma, S., Fujisawa, Y., Fujino, M., 2003. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422, 173-176.

8.4 Homo sapiens putative G protein-coupled receptor (GPR40) gene, complete cds,

GenBank accession number AF024687,
923 bp DNA linear

```
CGGCGGCCCCATGGACCTGCCCCCGCAGCTCTCCTTCGGCCTCTATGTGGC
CGCCTTTGCGCTGGGCTTCCCGCTCAACGTCCTGGCCATCCGAGGCGCGAC
GGCCCACGCCCGGCTCCGTCTCACCCCTAGCCTGGTCTACGCCCTGAACCT
GGGCTGCTCCGACCTGCTGCTGACAGTCTCTCTGCCCTGAAGGCGGTGGA
GGCGCTAGCCTCCGGGGCCTGGCCTCTGCCGGCCTCGCTGTGCCCCGTCTT
CGCGGTGGCCCACTTCTTCCCACTCTATGCCGGCGGGGGCTTCCTGGCCGC
CCTGAGTGCAGGCCGCTACCTGGGAGCAGCCTTCCCCTTGGGCTACCAAGC
CTTCCGGAGGCCGTGCTATTCCTGGGGGGTGTGCGCGGCCATCTGGGCCCT
CGTCCTGTGTCACCTGGGTCTGGTCTTTGGGTTGGAGGCTCCAGGAGGCTG
GCTGGACCACAGCAACACCTCCCTGGGCATCAACACACCGGTCAACGGCTC
TCCGGTCTGCCTGGAGGCCTGGGACCCGGCCTCTGCCGGCCCGGCCCGCT
TCAGCCTCTCTCCTGCTCTTTTTTCTGCCCTTGGCCATCACAGCCTTCTGC
TACGTGGGCTGCCTCCGGGCACTGGCCGCTCCGGCCTGACGCACAGGCG
GAAGCTGCGGGCCGCCTGGGTGGCCGGCGGGGCCCTCCTCACGCTGCTGC
TCTGCGTAGGACCCTACAACGCCTCCAACGTGGCCAGCTTCCTGTACCCAA
TCTAGGAGGCTCCTGGCGGAAGCTGGGGCTCATCACGGGTGCCTGGAGTGT
GGTGCTTAATCCGCTGGTGACCGGTTACTTGGGAAGGGGTCCTGGCCTGAA
GACAGTGTGTGCGGCAAGAACGCAAGGGGGCAAGTCCCAGAAGTAACGCCA
CTGCT
```

Die Nukleotide, die in dieser Arbeit zielgerichtet mutiert worden sind (siehe 5.2.1.2) und zum Einbau einer veränderten Aminosäure im Vergleich zum Wildtyp führen, sind rot hervorgehoben. Die aus technischen Gründen eingefügten Sense-Mutationen, die keine Veränderung der Aminosäure zur Folge hatten, sind grün hervorgehoben. Quelle der Gensequenz: NCBI GenBank, Zugangsnummer: AF024687.

8.5 Der genetische Standardcode

Codon-Sonne

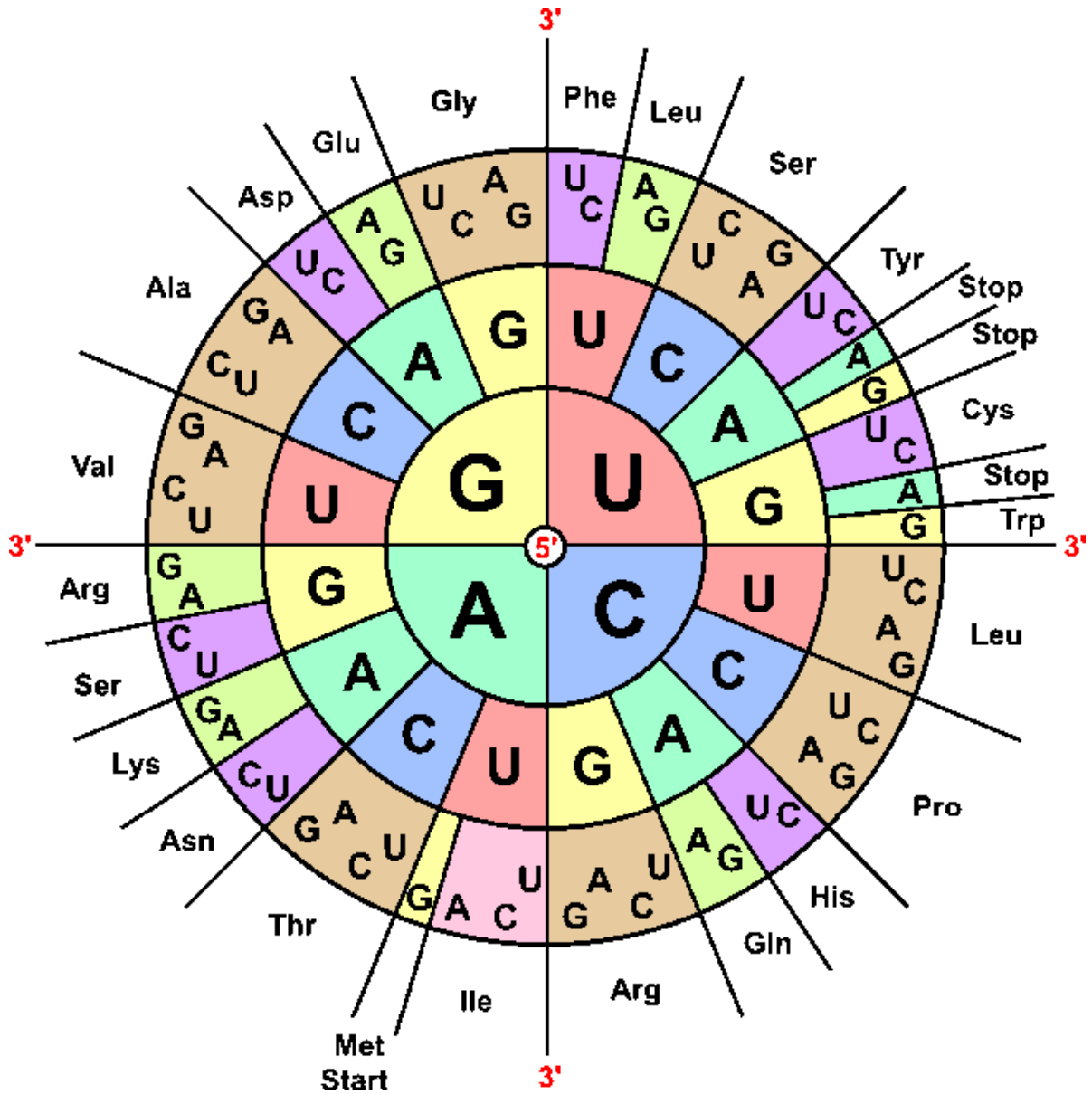


Abb. 17: Die „Codon-Sonne“ zeigt die 20 Aminosäuren, die in Proteinen verwendet werden und die RNA-Codons, die für sie in der Translation codieren. Die in der Abbildung verwendeten Basen sind A wie Adenin, G wie Guanin, C wie Cytosin und U wie Uracil der mRNA. In der DNA wird statt Uracil Thymin (T) verwendet. Quelle: www.wikipedia.org/wiki/Genetischer_Code.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Susanne Schnell
Geburtsdatum: 07.12.1974
Geburtsort: Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang:

01/2007 - 06/2007 Verfassen der vorliegenden Dissertation
04/2004 - 12/2006 Durchführung der Experimente zu dieser Arbeit
06/2005 - 12/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin der Charité Berlin
09/2003 - 05/2005 Wissenschaftliche Angestellte in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover
06/2003 - 08/2003 Gastwissenschaftliche Mitarbeit in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Hochschulausbildung:

1999 - 2003 Hauptstudium der Ökotoxikologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Diplom-Ökotoxikologin
1997 - 1999 Grundstudium der Ökotoxikologie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
1995 - 1997 Pharmaziestudium an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina in Braunschweig

Auslandserfahrung:

1994 - 1995 Teilnahme an einem 12-monatigen Au-Pair-Programm in New Jersey, USA

Schulbildung:

1994 Abitur am Fachgymnasium Ernährung und Hauswirtschaft in Hameln

Publikationen

Böer, U, Eglins, J, Krause, D, Schnell S, Schöfl C, Knepel, W (2007). Enhancement by lithium of cAMP-induced CRE/CREB-directed gene transcription conferred by TORC to the CREB basic region leucine zipper domain. *Biochem J.* 2007 Aug 14; [Epub ahead of print].

Schnell S, Schaefer M, Schöfl C (2007). Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from β -cells through activation of GPR40. *Molecular and Cellular Endocrinology* 263, 173-180.

Schaefer M, Mischak H, Schnell S, Griese A, Jakoubov R, Riepenhausen G, Schöfl C (2004). Mechanisms of arginine-vasopressin-induced Ca^{2+} oscillations in β -cells (HIT-T15): a role for oscillating protein kinase C. *Endocrinology* 145, 4635-4644.

Kongressbeiträge:

Vorträge auf internationalen und nationalen Kongressen:

1. **Schnell S, Schaefer, M., Schöfl C.** Oleic, myristic and linoleic acid stimulate insulin secretion through free fatty acid receptor 1 from pancreatic β -cells. *51. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie.* Salzburg, März 2007.
2. **Schnell S, Kolbe E, Schöfl C.** Freie Fettsäuren erhöhen die intrazelluläre Calciumkonzentration über eine Aktivierung von GPR40 in Betazellen. *40. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft.* Berlin, Mai 2005.

3. **Schnell S, Kolbe E, Schöfl C**. Free fatty acids increase cytosolic free calcium in INS-1 cells through activation of GPR40. *49. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie*. Münster, März 2005.

Posterpräsentationen auf nationalen und internationalen Kongressen:

1. **Rus R., Bumke-Vogt C, Schnell S, Andres J, Bähr V, Haag C, Schulze E, Frank-Raue K, Raue F, Schöfl C**. Functional analysis of six novel mutations of the calcium-sensing receptor in familial hypocalciuric hypercalcemia and autosomal dominant hypocalcemia. *51. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie*. Salzburg, März 2007.
2. **Iakoubov R, Schnell S, Rustenbeck I, Leitges M, Schöfl C**. Acetylcholine-induced Ca^{2+} signaling and insulin secretion from pancreatic beta-cells: distinct roles for protein kinase C β . *87th Annual Meeting of the Endocrine Society*. San Diego, Juni 2005.
3. **Schnell S, Leitges M, Schöfl C**. Acetylcholin-stimulierte Ca^{2+} -Signale in Proteinkinase C ϵ -defizienten Beta-Zellen. *8. Deutscher Insel-Workshop*. Goslar, April 2005.
4. **Schnell S, Leitges M, Schöfl C**. Acetylcholine-induced calcium signaling in pancreatic β -cells derived from protein kinase C epsilon deficient mice. *49. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie*. Münster, März 2005.

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Untersuchungen zur Bedeutung von GPR40 für die Generation Fettsäure-induzierter Ca^{2+} -Signale und die Fettsäure-stimulierte Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

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

Hannover im September 2007

Susanne Schnell

Danksagung

Die Experimente zu dieser Arbeit führte ich von **April 2004 bis Dezember 2006** in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover und der Abteilung für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin unter Anleitung von Prof. Dr. C. Schöfl durch.

Zunächst danke ich **Prof. Dr. C. Schöfl** für die Ermöglichung meiner Promotion, für die Bereitstellung der Gelder für meine BAT2a/2-Stelle sowie die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung im Rahmen meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt **Prof. Dr. W. Müller** für die Übernahme der Funktion des Hauptgutachters, seine besondere Hilfsbereitschaft sowie seine wertvolle Unterstützung im Promotionsverfahren.

Ganz besonders danke ich auch **Prof. Dr. B. Otto** für die Übernahme der Funktion des Zweitgutachters und **Prof. Dr. B. Huchzermeyer** für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bei der Disputation.

Ebenfalls gilt mein herzlicher Dank **Prof. Dr. M. Schaefer** aus dem Institut für Pharmakologie der Charité in Berlin, in dessen Arbeitsgruppe ich das Calciumimaging und die Mutagenese, die für diese Arbeit entscheidend waren, durchführen durfte und der mich durch seine ständige Hilfsbereitschaft bei der Lösung experimenteller Probleme und seine wertvollen Anregungen in hervorragender Weise unterstützt hat.

Vielen Dank an **Prof. Dr. A. Pfeiffer** aus dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIfE) Potsdam-Rehbrücke und an **PD Dr. J. Krauter** aus der Abteilung für Hämatologie, Hämostaseologie und Onkologie der Medizinischen Hochschule Hannover, in deren Arbeitsgruppen ich die Sequenzierung und die Insulinkonzentrationsmessungen bzw. die TaqMan-PCR durchführen durfte.

Für die ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung danke ich ganz herzlich **Rüdiger Horn, Martin Osterhoff, Janin Andres** und nicht zuletzt **Nadine Albrecht**.

Danke **Kerstin Göhrlich, Susann Richter, Birgit Faust, Julia Resch und Natascha Kremenevskaja** für die technische Unterstützung bzw. das Anlernen von Methoden.

Danke **Monika Seifert, Srinivas Rao, Axel Kupferschmidt, Martina Darnedde und Birgit Bremer** aus der Endokrinologie, die mich mein Einzelkämpferdasein in der MHH haben vergessen lassen.

Danke **Petra Exner, Jessie Weicht, Markus Sabath und Christiane Bumke-Vogt** für die angenehme Arbeitsatmosphäre in der Charité.

Von ganzem Herzen danke ich meiner **Familie und meinen Freunden**, die immer für mich da sind und mich unglaublich unterstützen. Dank Euch bin ich ein reicher Mensch.