

**Rolle der GPCR-Signaltransduktion bei der
Peptidhormonsekretion in neuroendokrinen Zellen im Darm
und im Pankreas**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft

Fachgebiet Biochemie der Ernährung

vorgelegt von

Stefanie Leicht

aus Eningen

2008

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Breer
1. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat. Lutz Graeve
2. berichtende Person: Prof. Dr. med. Stephan Bischoff

Eingereicht am: 31.01.2008
Mündliche Prüfung am: 25.04.2008

Die vorliegende Arbeit wurde am 09.04.2008 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

„Discovery consists of seeing
what everybody has seen
and thinking what
nobody has thought.“ Szent-Györgyi

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Hormonelle Kontrolle der Nahrungsaufnahme.....	1
1.2 GLP-1	2
1.2.2 Physiologische Bedeutung von GLP-1	3
1.2.3 GLP-1 Sekretion und Regulation	3
1.3 GLP-1 und Insulinsekretion.....	6
1.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	8
1.5 Proliferation und Apoptose von L-Zellen und β-Zellen.....	10
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Laborgeräte	15
2.1.3 Sonstige Materialien und Reagenzien	16
2.1.4 Kits (kommerzielle Reagenziensätze)	18
2.1.5 Enzyme	18
2.1.6 Antikörper	19
2.1.7 Primer	20
2.1.8 Sonden	20
2.1.9 Zelllinien.....	20
2.1.9 Medien und Puffer	22
2.1.10 Zellkulturmaterialien.....	22
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.2.1 Reverse Transkription.....	23
2.2.2 PCR	23
2.2.3 Real-Time-PCR (SYBR Green)	23
2.2.4 Real-Time-PCR (TaqMan).....	24

2.2.5 Klonierung.....	25
2.2.6 Transformation.....	26
2.2.7 Restriktionsanalyse.....	27
2.2.8 Maxipräparation	27
2.2.9 Sequenzierung.....	27
2.3 Zellkultur	28
2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken	28
2.3.2 Transfektion	28
2.3.3 Selektion von Einzelzellklonen	29
2.4 RNA-Isolation.....	29
2.4.1 RNA-Isolation aus Zellen	29
2.4.2 RNA-Isolation aus Gewebe	30
2.5 Western Blot Analyse	30
2.5.1 Aufarbeitung der Proben und Quantifizierung	31
2.5.2 Protein SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.5.3 Western Blot	32
2.5.4 Immundetektion	32
2.5.5 Strippen des Blots.....	32
2.6 Ex-vivo Tiermodelle	33
2.6.1 Isolierung von Darmkolonstücken.....	33
2.6.2 Isolierung von primären Inselzellen	33
2.7 Sekretionsstudien	35
2.7.1 Sekretion von GLP-1 in vitro und ex vivo.....	35
2.7.2 Sekretion von Insulin in vitro und ex vivo.....	36
2.8 Signaltransduktionsmechanismen	38
2.8.1 IP ₁ -Generierung in STC-1 Zellen.....	38
2.8.2 Messung von intrazellulärem Kalzium mit dem FLIPR ^{TETRA} (Fluorometric imaging plate reader).....	39
2.8.3 ERK1/2-Phosphorylierung in STC-1 Zellen	39
2.9 Proliferationsassay: [¹⁴C]-Thymidineinbau in STC-1 Zellen.....	40
2.10 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	41

2.10.1 Prinzip der Immunfluoreszenzmikroskopie	41
2.10.2 Immunfluoreszenzmarkierung in 1321N1/hGPR120 Zellen	41
2.10.3 Immunfluoreszenzmarkierung in Rattendarm und –pankreas bzw. Mausdarm und -pankreas	42
3 ERGEBNISSE	44
3.1 Untersuchungen zur Expression verschiedener GPCR-Gene in L- Zellmodellen und im Rattendarm.....	44
3.2 Untersuchung der Proteinexpression unterschiedlicher GPCRs im Rattenileum und Rattenkolon.....	45
3.3 Untersuchung der Lokalisation von GPR40, GPR119 und GPR120 in Ratten- und Mausdarm mittels Immunfluoreszenz	47
3.4 Charakterisierung von GPR40 und GPR120 in überexprimierenden Zellsystemen und in STC-1 Zellen	50
3.4.1 Klonierung von pcDNA3.1/ 5V-His_hGPR120	50
3.4.2 Nachweis der GPR120 Proteinexpression in 1321N1/hGPR120 Zellen.....	52
3.4.3 Einfluss von langkettigen Fettsäuren und GPR40 Agonisten auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration	52
3.4.4 Einfluss von langkettigen Fettsäuren und GPR40 Agonisten auf die intrazelluläre IP ₁ Bildung	56
3.5 GLP-1 Sekretionsstudien an unterschiedlichen in vitro und ex vivo Modellen	59
3.5.1 GLP-1 Freisetzung aus den STC-1 Zellen.....	59
3.5.2 GLP-1 Freisetzung aus Rattenkolon.....	66
3.6 Proliferationsuntersuchungen in STC-1 Zellen	70
3.6.1 Untersuchung der ERK1/2 Phosphorylierung in STC- 1 Zellen.....	71
3.6.2 Untersuchung der Akt-Phosphorylierung in STC- 1 Zellen.....	74
3.6.3 [¹⁴ C]-Thymidineinbau in STC-1 Zellen	75
3.7 Untersuchung der Apoptose in STC-1 Zellen durch Messung der Caspase- 3 Aktivität	76
3.8 Untersuchung der Expression verschiedener Gene in β-Zelllinienmodellen und Ratteninseln	79

3.9 Untersuchung der Lokalisation von Proteinen in Ratten- und Mauspankreas	80
3.10 Insulinsekretionsstudien an unterschiedlichen in vitro und ex vivo Modellen	83
3.10.1 Insulinsekretion aus Min6c4 und INS-1E Zellen	83
3.10.2 Insulinsekretion aus isolierten Ratteninseln.....	87
3.11.3 Insulinsekretion aus primären Mausinseln.....	88
3.11 Apoptose- und Proliferationsuntersuchungen in Min6c4 Zellen	90
3.11.1 Untersuchung der ERK1/2 Phosphorylierung in Min6c4 Zellen.....	90
3.11.2 Untersuchung der Akt Phosphorylierung in Min6c4 Zellen.....	92
3.11.3 Untersuchung der Apoptose in Min6c4 Zellen durch Messung der Caspase-3 Aktivität.....	93
4 DISKUSSION	95
4.1 Expression und Lokalisation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren im Darm und im Pankreas	95
4.2 Charakterisierung der G_{αq}-gekoppelten Rezeptoren GPR40 und GPR120 in transfizierten Zellen	99
4.3 Sekretion von GLP-1 in vitro und ex vivo	101
4.3.1 GLP-1 Sekretionsstudien an der STC-1 Zelllinie	101
4.3.2 GLP-1 Sekretionsstudien am ex vivo Rattenkolonmodell.....	105
4.4 Sekretion von Insulin in vitro und ex vivo	106
4.4.1 Insulinsekretionsstudien mit den INS-1E und Min6 Zelllinien	106
4.3.2 Insulinsekretionsstudien aus primären Ratten- und Mausinseln	109
4.5 Apoptose und Proliferation von L-Zellen und β-Zellen in vitro	110
5 SCHLUSSFOLGERUNG	114
6 ZUSAMMENFASSUNG	116
7 SUMMARY	117
8 LITERATUR	118

9 ANHANG	136
9.1 Abkürzungsverzeichnis	136
9.2 Erklärung	138
9.3 Danksagung	139
9.4 Lebenslauf	140

1 Einleitung

1.1 Hormonelle Kontrolle der Nahrungsaufnahme

Die Regulation der Nahrungsaufnahme umfasst eine Vielzahl metabolischer, endokriner und neuronaler Prozesse. Einen wesentlichen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und –verwertung haben die postprandial ausgeschütteten gastrointestinalen Hormone [1, 2].

Der Darm ist das größte hormonproduzierende Organ im menschlichen Körper, sowohl bezüglich der Anzahl an endokrinen Zellen wie auch hinsichtlich der Anzahl an Hormonen, die gebildet werden [3]. Gastrointestinale Hormone werden in diffus verteilten endokrinen Zellen der Darmmukosa entlang des gesamten Gastrointestinaltraktes gebildet und freigesetzt. Durch die Reizwirkung intraluminaler Nahrungsbestandteile, aber auch durch die Wirkung anderer Hormone und Neurotransmitter werden diese Hormone ausgeschüttet, erreichen auf endokrinem, parakrinem, autokrinem und neurokrinem Weg ihre Zielzellen und regulieren viele Körperfunktionen. Unter anderem haben viele gastrointestinale (GI) Hormone einen Einfluss auf die Sättigung, Nahrungsaufnahme, Magenentleerung und den postprandialen Metabolismus (Abb. 1-1).

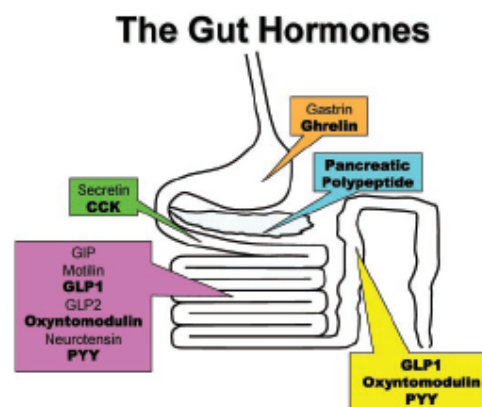


Abb. 1-1: Gastrointestinale Hormone. Fettgedruckte Hormone beeinflussen die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht [1].

1.2 GLP-1

GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) wurde zum ersten Mal in der cDNA eines Anglerfisches als eine dem Glukagon ähnliche Substanz beschrieben [4, 5]. GLP-1 wird in den L-Zellen des Dünndarms und Kolons aus dem Vorläufergen Proglukagon nach posttranslationaler Modifikation gebildet [6].

Die GLP-1 produzierenden L-Zellen sind im Darm hauptsächlich im Ileum und Kolon lokalisiert. Dabei handelt es sich um „open-type“ endokrine Zellen, die sich wie andere enterochrine Zellen (z.B. K-Zellen) zwischen den Epithelzellen in den Lieberkühnschen Krypten und intestinalen Villi befinden (Abb. 1-2). Die Mikrovilli der charakteristisch apikal polarisierten L-Zellen ragen in das Darmlumen, basolateral befinden sich nahe der Blutbahn die Sekretgranula, die prozessiertes GLP-1 enthalten [7, 8]. Die L-Zellen liegen nicht nur in direkter Nähe zu Blutgefäßen sondern auch zu Nervenfasern, so dass die GLP-1 Sekretion sowohl durch hormonelle wie auch durch neuronale Signale beeinflusst werden kann und das freigesetzte GLP-1 Nervenfasern aktiviert und in die Blutbahn gelangt [10, 11].

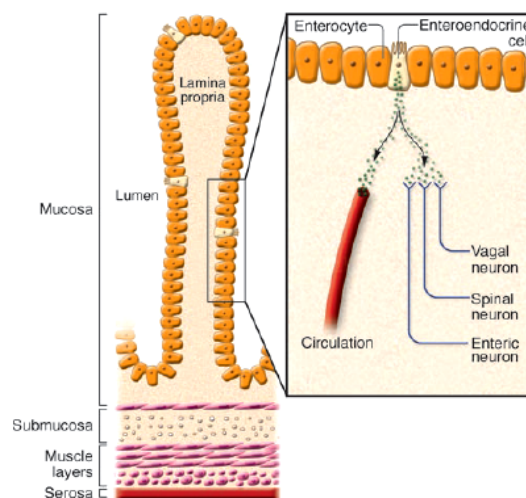


Abb. 1-2: Schematisches Modell enteroendokriner Zellen und Enterocyten eines Villi in der Dünndarmwand. Die enteroendokrinen Zellen sind polarisierte Zellen mit Sekretgranula, die sich an der Basis der Zellen befinden [12].

L-Zellen werden hauptsächlich in den unteren Darmabschnitten exprimiert. Die höchste Expression findet man im Ileum, Kolon und Rektum [8, 13], wobei auch im Duodenum die Lokalisation von L-Zellen nachgewiesen werden konnte [14]. Zur Morphologie und Lokalisation der GLP-1 sekretierenden L-Zellen gibt es bisher allerdings noch keine immunhistochemischen Daten.

1.2.2 Physiologische Bedeutung von GLP-1

GLP-1 erfüllt eine Reihe unterschiedlicher Aufgaben im humanen Metabolismus. Es stimuliert die glukoseabhängige Insulinsekretion aus den β -Zellen und inhibiert die Glukagonausschüttung aus den α -Zellen im Pankreas, indem es an den GLP-1 Rezeptor bindet. Der GLP-1 Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der an ein G-Protein mit einer $G_{\alpha s}$ -Untereinheit bindet. GLP-1 stimuliert darüber hinaus die Transkription des Proinsulingens und die Biosynthese von Insulin [21-25]. Außerdem stimuliert GLP-1 die Proliferation und Neogenese von β -Zellen [26, 27]. Dadurch spielt GLP-1 eine wichtige Rolle bei der postprandialen Kontrolle der Blutglukosehomöostase. Diese Wirkung wird als Inkretineffekt bezeichnet. Er beschreibt die Wirkung gastrointestinaler Hormone (Inkretine), die nach Nahrungsaufnahme freigesetzt werden und im folgenden die Insulinsekretion aus dem endokrinen Pankreas stimulieren und den postprandial erhöhten Blutglukosespiegel senken [28]. Diese funktionelle Verbindung zwischen Darm und Pankreas wird als „Enteroinsulinäre Achse“ bezeichnet [29]. GLP-1 inhibiert die Magenentleerung und die Säuresekretion im Magen sowie die Nahrungs- und Wasseraufnahme über seine Rezeptorbindung im Hypothalamus. In Leber-, Muskel- und Fettgewebe stimuliert GLP-1 die Glykogensynthese bzw. die Lipogenese [15-20]. Das biologisch aktive GLP-1 wird jedoch wenige Minuten nach Ausschüttung in den Blutkreislauf durch die Dipeptidylpeptidase IV abgebaut und dadurch enzymatisch inaktiviert [30, 31].

1.2.3 GLP-1 Sekretion und Regulation

Die GLP-1 Sekretion wird postprandial induziert und erhöht sich proportional zur Mahlzeitgröße [32]. Die basale GLP-1 Plasmakonzentration im Nüchternzustand beträgt 0,4 – 1,4 pmol/l und erreicht postprandial eine Konzentration von 10 – 12 pmol/l [33].

Die postprandiale GLP-1 Freisetzung ist biphasisch: die frühe Phase beginnt innerhalb weniger Minuten nach Nahrungsaufnahme und dauert ungefähr 60 min an. Danach folgt die zweite Phase bis 120 min nach Nahrungsaufnahme.

Lange Zeit wurde angenommen, dass die L-Zellen ausschließlich im distalen Ileum und im Kolon lokalisiert sind [8, 13, 32]. Deshalb wurde vermutet, dass die GLP-1 Sekretion in der ersten Phase indirekt durch die Hormone Leptin, das Gastrin-releasing peptide (GRP) und das Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), das enterische Nervensystem sowie über die Aktivierung afferenter und

efferenter Vagusnerven stimuliert wird [11, 34-39]. Es wurde angenommen, dass Nährstoffe wie Glukose im Duodenum die GIP- Sekretion aus den K-Zellen erhöhen. GIP aktiviert enterische Neurone und vagale afferente Nervenfasern. Daraufhin werden vagale Efferenzen stimuliert, die über eine Ausschüttung von Acetylcholin und GRP die GLP-1 Sekretion aktivieren [11, 40, 41]. In Nagern konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass Leptin einen stimulatorischen Einfluss auf die GLP-1 Sekretion hat [41]. Bei Mäusen führte eine Gabe von α -Linolensäure in das Duodenum, Ileum und Kolon nur im Kolon zu einer signifikanten GLP-1 Sekretion [42]. Adachi et al. schlossen daraus, dass die frühe postprandiale GLP-1 Ausschüttung nicht durch die direkte Wirkung von Nährstoffen hervorgerufen wird. Theodorakis et al. [43] zeigten jedoch, dass L-Zellen beim Menschen nicht nur im distalen Darm exprimiert werden, sondern dass ein geringer Anteil an L-Zellen auch im Duodenum lokalisiert ist. Deshalb kann der frühe Anstieg an Plasma-GLP-1 auch durch eine direkte Stimulierung der L-Zellen im Duodenum erklärt werden, ohne dass neuroendokrine Signalwege involviert sind. In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass L-Zellen im humanen Duodenum exprimiert werden und dass ihre Stimulierung mit Glukose und anderen Süßstoffen die GLP-1 Sekretion in der ersten Phase stimuliert [14]. Somit scheinen in der ersten Sekretionsphase sowohl GIP und andere Hormone, das enterische Nervensystem, sowie afferente und efferente Nerven an der GLP-1 Sekretion beteiligt zu sein, aber auch Nährstoffe wie Glukose haben einen direkten Einfluss auf die GLP-1 Sekretion in duodenal lokalisierten L- Zellen. Glukose spielt bei der Regulation der GLP-1 Sekretion aus den L-Zellen eine wichtige Rolle. In unterschiedlichen in vivo und in vitro Modellen konnte beobachtet werden, dass Glukose die GLP-1 Sekretion konzentrationsabhängig stimuliert [33, 44-49]. Elektrophysiologische Studien zeigten, dass Glukose in murinen L-Zellen durch das Schließen von ATP-sensitiven Kaliumkanälen eine Membranpotentialänderung hervorruft. Außerdem wird durch den Cotransport von Natrium und Glukose über den natriumabhängigen Glukosetransporter 1 (SGLT1) eine Membrandepolarisation in der L-Zelle ausgelöst [45, 46]. Diese Membrandepolarisation, verursacht durch das Schließen ATP-abhängiger Kaliumkanäle und durch den Transport von Natrium in das Cytoplasma, führt zu einem Öffnen von spannungsabhängigen Kalziumkanälen und folglich zu einem Kalziumeinstrom in das Cytoplasma. Dadurch kommt es zu einer Verschmelzung von GLP-1 Granula mit der Plasmamembran und zur Exozytose von GLP-1. In Studien, in denen der Darm von Nagern und Kaninchen perfundiert wurde, wurde bestätigt, dass die glukoseinduzierte GLP-1 Sekretion

natriumabhängig ist [47, 50]. Jang et al. [14] untersuchten darüber hinaus die Rolle der Geschmacksrezeptoren T1R2 und T1R3 bei der glukoseinduzierten GLP-1 Sekretion aus duodenalen L-Zellen. Die beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren heterodimerisieren und bilden in den L-Zellen den Rezeptor für Glukose und andere Süßstoffe. Die Aktivierung des Heterodimers führt zur Stimulierung des G-Proteins Gustducin, was eine Erhöhung der GLP-1 Sekretion zur Folge hat. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Fruktose natriumunabhängig die GLP-1 Sekretion stimuliert. Fruktose wird über den passiven GLUT5 Transporter in die Zelle transportiert, verstoffwechselt und stimuliert wie Glukose über die Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration die GLP-1 Sekretion [47].

Der Anstieg der GLP-1 Sekretion in der zweiten Phase wird durch einen direkten Kontakt von Nährstoffen mit den L-Zellen im unteren Gastrointestinaltrakt ausgelöst [42]. Da nur noch geringe Glukosemengen den distalen Darm erreichen, wird vermutet, dass Fett, welches bis zum Ileum und weiter transportiert wird, in dieser zweiten Sekretionsphase der physiologische Hauptstimulator ist [11]. Dabei wird die Hormonausschüttung durch langkettige ungesättigte nicht aber durch kurzkettige oder gesättigte Fettsäuren stimuliert [51, 52]. Langkettige Fettsäuren interagieren mit den beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren GPR40 und GPR120. Die Funktion von GPR40 in der pankreatischen β -Zelle wurde in der Vergangenheit bereits näher charakterisiert. Der Rezeptor wird in Insulinomazelllinien exprimiert und ist bei der fettsäureinduzierten Verstärkung der Insulinsekretion aus den β -Zellen und bei der Glukagonfreisetzung aus den α -Zellen des Pankreas beteiligt [53-57]. Es konnte gezeigt werden, dass langkettige ungesättigte Fettsäuren wie Docosahexaensäure oder α -Linolensäure die Insulinsekretion glukoseabhängig über die Aktivierung von GPR40 stimulieren [53]. GPR120 und GPR40 werden in der enteroendokrinen murinen STC-1 Zelllinie, ein L-Zellmodell, exprimiert. Eine Stimulation dieser Zellen mit den oben genannten langkettigen Fettsäuren führt zu einer konzentrationsabhängigen GLP-1 Sekretion [58]. Die Signaltransduktionswege, die durch die GPR120- und GPR40-Aktivierung aktiviert werden und mögliche andere fettsäureabhängige Mechanismen, die zur GLP-1 Sekretion führen, sind noch nicht vollständig verstanden.

In L-Zellen werden weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren exprimiert, darunter GPR119 [59]. Dieser Rezeptor wurde vor wenigen Jahren identifiziert und charakterisiert und wird hauptsächlich in den β -Zellen exprimiert [60, 61]. In den β -Zellen stimuliert GPR119 glukoseabhängig die Insulinsekretion [62-64].

Untersuchungen in vitro und in vivo weisen darauf hin, dass GPR119 bei der GLP-1 Sekretion in L-Zellen eine Rolle spielt [59].

Gallensäuren wirken im murinen STC-1 Zellmodell ebenfalls als GLP-1 Sekretagoga [65]. Der G-Protein gekoppelte Rezeptor TGR5 wurde als Rezeptor für Gallensäuren identifiziert und vermittelt die gallensäureinduzierte GLP-1 Sekretion. Proteine scheinen im Gegensatz zu Kohlenhydraten und Fetten keinen Einfluss auf die Regulation der GLP-1 Sekretion zu haben [32, 33], jedoch sind kleine Peptide und Aminosäurehydrolysate in der Lage die GLP-1 Ausschüttung zu stimulieren [66, 67].

Wie bereits beschrieben wurde die nervöse Regulation der GLP-1 Sekretion untersucht, wobei die Ergebnisse darauf hindeuten, dass eine vagale cholinerg muskarinische Regulation bei der GLP-1 Ausschüttung eine Rolle spielt [68]. Cholinerge Agonisten stimulieren die GLP-1 Sekretion aus dem Rattenkolon [39]. Die muskarinischen Rezeptoren M1 und M2 spielen bei der Regulation der GLP-1 Sekretion aus fetalen Ratten L-Zellen und aus NCI-H716 Zellen, einer humanen L-Zelllinie, eine Rolle [11, 41]. Jedoch ist die vagale cholinerge Innervierung im Menschen unklar und erfordert noch weitere Untersuchungen. GIP scheint die GLP-1 Sekretion in Nagern direkt aber auch vagal cholinerg zu stimulieren [11, 68]. Darüber hinaus scheint das sympathische Nervensystem einen Einfluss auf die GLP-1 Sekretion zu haben. Eine β -adrenerge Stimulation der Hormonausschüttung wurde im perfundierten Rattendarm beobachtet [39]. Außerdem konnte in unterschiedlichen in vivo und in vitro Modellen gezeigt werden, dass die GLP-1 Sekretion durch GRP (Gastrin-releasing peptide) stimuliert wird [11, 68].

1.3 GLP-1 und Insulinsekretion

Die Insulinsekretion aus den Langerhans'schen Inseln des Pankreas (abgekürzt: Inseln) wird im physiologischen Zustand durch unterschiedliche Stimulantien ausgelöst, wobei Glukose der Hauptstimulus ist. Die physiologische Glukosekonzentration beim gesunden Menschen liegt bei 5 bis 5,5 mmol/l. Postprandial werden je nach Nahrungsaufnahme Glukosekonzentrationen von bis zu 20 mmol/l erreicht [69]. Diese Konzentrationserhöhung der Plasmaglukose führt zur Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas. Bei einem Anstieg des Blutglukosespiegels wird vermehrt Glukose über den passiven Transporter GLUT2 in die β -Zelle hineintransportiert. Durch oxidative Metabolisierung der Glukose wird ATP gebildet. Die erhöhte intrazelluläre ATP-Konzentration führt dazu, dass ATP-

abhängige Kaliumkanäle (K^+_{ATP} -Kanal) geschlossen werden. Die Folge davon ist eine Membrandepolarisation. Dadurch werden spannungsabhängige Kalziumkanäle (L-type channels) geöffnet und es kommt zu einem Kalziumeinstrom in das Cytoplasma. Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration löst wie bei der GLP-1 Sekretion in der L-Zelle eine Verschmelzung der Insulingranula mit der Plasmamembran und folglich eine Exozytose aus [70-73]. In der β -Zelle wie auch in der L-Zelle gibt es weitere Mechanismen, die die Insulinfreisetzung stimulieren, wobei diese Mechanismen z.T. amplifizierend auf die glukoseinduzierte Insulinsekretion wirken. In der β -Zelle werden unterschiedliche G-Protein gekoppelte Rezeptoren exprimiert, wie z.B. der GLP-1 Rezeptor, der CCK-A Rezeptor und der GIP Rezeptor. Die GLP-1 vermittelte Insulinsekretion über den GLP-1 Rezeptor ist glukoseabhängig, d.h. GLP-1 hat einen amplifizierenden Einfluss auf die glukoseinduzierte Insulinsekretion [19, 74-76]. Es ist weiter bekannt, dass GPR40 und GPR119 in der β -Zelle exprimiert werden [53, 60]. Wie auch in den L-Zellen binden langkettige ungesättigte Fettsäuren an GPR40 und infolge dessen wird die Insulinsekretion stimuliert, wobei die fettsäureinduzierte Insulinsekretion glukoseabhängig ist, d.h. Fettsäuren stimulieren die Insulinsekretion als Potenziatoren und nicht als Initiatoren [53]. Die Insulinsekretion kann außerdem über GPR119 stimuliert werden, Liganden wie Oleylethanolamid (OEA) binden an GPR119 und sind in der Lage, die glukoseinduzierte Insulinsekretion zu erhöhen [62, 63, 77]. Anhand der Stimulus-Sekretionskopplung [73] in der L-Zelle bezüglich GLP-1 und in der β -Zelle bezüglich Insulin wird deutlich, dass zwischen diesen Zelltypen sehr viele Parallelen hinsichtlich der Expression einiger Rezeptoren und bezüglich der Sekretionsstimulation zu beobachten sind.

Das Zusammenspiel dieser Stimulus-Sekretionsmechanismen trägt in der β -Zelle dazu bei, dass unter physiologischen Bedingungen genügend Insulin aus den β -Zellen ausgeschüttet wird, so dass die Aufnahme von Glukose in periphere Organe gewährleistet wird. Beim Diabetes mellitus, einer Stoffwechselerkrankung, die weltweit 246 Millionen Menschen betrifft [78], ist dieses physiologische Regulationssystem gestört. Charakteristisch für Diabetes mellitus ist eine chronische Hyperglykämie verursacht durch einen Insulinmangel und/ oder durch eine Insulinresistenz [79] in insulinsensitiven Geweben wie Leber, Muskel- und Fettgewebe.

Klinisch relevant sind vor allem der Typ 1 Diabetes (IDDM, Insulin Dependent Diabetes Mellitus) und der Typ 2 Diabetes (NIDDM, Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus). Beim Typ 1 Diabetes handelt es sich um eine Gruppe von

Autoimmunerkrankungen, die zu einer Zerstörung der β -Zellen führen. Die Folge davon ist ein absoluter Insulinmangel. Dadurch kann die Glukosehomöostase nicht mehr aufrecht erhalten werden. Kennzeichen ist eine geringe oder fehlende Insulinsekretion mit starken Blutglukoseschwankungen und einer meist raschen Progredienz [80, 81]. Bei diesen Patienten muss Insulin exogen zugeführt werden. Der Typ 2 Diabetes ist durch eine Insulinresistenz und eine gestörte Insulinsekretion gekennzeichnet und steht oft in Zusammenhang mit Übergewicht und dem metabolischen Syndrom [82]. Um die Insulinresistenz zu kompensieren, reagieren die β -Zellen mit einer erhöhten Insulinsekretion (Hyperinsulinämie) [83-85]. Diese erhöhte Insulinsekretion belastet die β -Zellen und führt schließlich zur β -Zellapoptose und dadurch zu einem relativen Insulinmangel und hat eine chronische Hyperglykämie zur Folge.

1.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (G-protein-coupled receptors, GPCRs) sind membranständige Rezeptoren mit mehr als 800 Vertretern [86]. Viele biologische Funktionen werden durch Bindung extrazellulärer Liganden, wie Hormone, Neurotransmitter, visuelle, olfaktorische und gustatorische Signale vermittelt. Topologisch handelt es sich um Sieben-Transmembran-Rezeptoren (7TM-Rezeptoren), d.h. das Protein durchspannt die Membran mit sieben Helices, welche durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind [87]. Extrazellulär befindet sich der N-Terminus, intrazellulär liegt der C-terminale Abschnitt, welcher selektiv an der G-Protein Ankopplung und somit an der Aktivierung unterschiedlicher Effektormoleküle beteiligt ist [88, 89]. Die Größe der Rezeptoren ist unterschiedlich und reicht von weniger als 300 Aminosäuren (z.B. Adrenokortikotropin-Rezeptor) bis hin zu mehr als 1100 Aminosäuren (z.B. metabotrope Glutamatrezeptoren) [90].

Die Bindung eines Liganden an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor führt zu dessen Konformationsänderung. Dadurch kommt es zu einer Ankopplung des Rezeptors an ein heterotrimeres G-Protein (Guanosintriphosphat (GTP)- bindendes Protein). Diese G-Proteine bestehen aus jeweils einer α , β und γ Untereinheit. Die Formation des Rezeptor-G-Protein-Komplexes hat einen Austausch von GDP durch GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins zur Folge, die dann von der $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert und zur Bildung von einem oder mehreren sekundären Botenstoffen führt [87]. Nach einer gewissen Zeit wird die GTPase Aktivität der α -

Untereinheit des G-Proteins erhöht und dadurch spaltet sich das gebundene GTP in GDP + P_i. Die α-Untereinheit des G-Proteins kann dadurch wieder mit der βγ-Untereinheit reassoziieren und der Trimerkomplex steht nun für eine erneute Aktivierung zur Verfügung. Es findet also eine Selbstregulierung statt (Abb. 1-3).

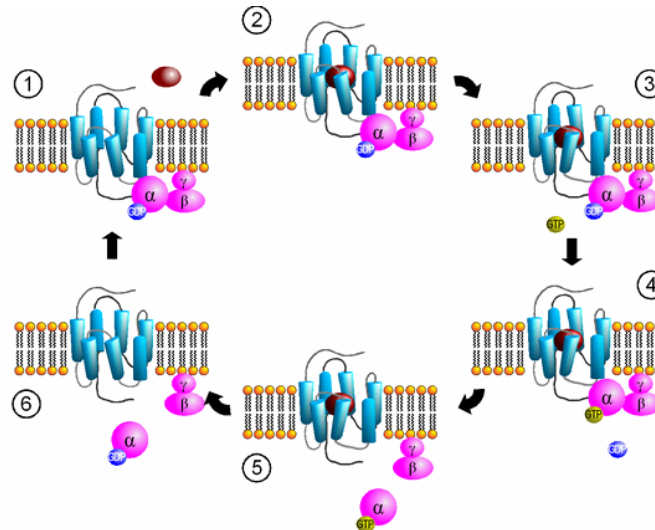


Abb. 1-3: Die Aktivierung von G-Proteinen. Die Zahlen 1–6 bezeichnen den Verlauf der Aktivierung und Inaktivierung von G-Proteinen durch die Bindung eines Liganden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren ([http:// wikipedia.org](http://wikipedia.org)).

G-Proteine werden, entsprechend ihrer α-Untereinheiten, in vier Unterfamilien eingeteilt: G α_s (incl. G α_{olf}), G $\alpha_{i/o}$ (incl. G α_t , G α_{gust} und G α_2), G $\alpha_{q/11}$ (incl. G α_{14} , G α_{15} , und G α_{16}) und G $\alpha_{12/13}$ [91-93]. Die als G α_s bezeichneten Unterfamilien führen zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase, die G $\alpha_{i/o}$ Unterfamilie hemmt dagegen die Adenylatzyklase. Eine Aktivierung des Enzyms Phospholipase C-β wird über die G $\alpha_{q/11}$ Unterfamilie ausgelöst. Die Unterfamilie G $_{12}/G_{13}$ aktiviert die c-Jun N-terminale Kinase [94].

Bei GPR120 und GPR40 handelt es sich um G $\alpha_{q/11}$ -gekoppelte G-Proteine. Liganden dieser beiden Rezeptoren sind langkettige ungesättigte Fettsäuren. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor und der Aktivierung des G-Proteins stimuliert die dissoziierte α-Untereinheit die Phospholipase C-β, welche dann die Spaltung von Phosphatidylinositoldiphosphat in Diacylglycerol und D-myoinositoltriphosphat (IP₃) hydrolysiert. IP₃ diffundiert ins Cytoplasma und bindet an Kalziumkanäle am Endoplasmatischen Reticulum. Infolge dessen werden die Kalziumkanäle geöffnet und Kalzium diffundiert ins Cytoplasma [95]. In der L-Zelle führt die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration zu einer kalziuminduzierten Verschmelzung von GLP-1 Granula mit der Plasmamembran und führt dadurch zu einer Sekretion von GLP-1 [58].

Bei GPR119 handelt es sich um einen G_{α_s} -gekoppelten Rezeptor, d.h. die dissoziierte α -Untereinheit stimuliert die Adenylatzyklase. Dieses membrangebundene Enzym katalysiert nach seiner Aktivierung die Bildung von zyklischem AMP (cAMP) aus ATP. cAMP aktiviert daraufhin die Proteinkinase A. Dadurch werden ebenfalls intrazelluläre Kalziumspeicher mobilisiert und Kalzium in das Cytoplasma freigesetzt, was die Insulinsekretion in β -Zellen stimuliert.

1.5 Proliferation und Apoptose von L-Zellen und β -Zellen

Wie in 1.2.1 bereits erwähnt, stimuliert GLP-1 in der β -Zelle nicht nur die Insulinausschüttung, sondern verstärkt auch die β -Zellproliferation, verbessert die β -Zellneogenese und inhibiert die β -Zellapoptose [26, 26, 96]. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Stimulierung des GLP-1 Rezeptors zu einer erhöhten β -Zellproliferation führt [23, 25, 97-99]. Die proliferative und antiapoptotische Wirkung von GLP-1 umfasst verschiedene Signaltransduktionswege, die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K), welche die Proteinkinase $C\xi$ und Akt (PKB, Proteinkinase B) aktiviert, sowie die Aktivierung des PKA/ Ras /Raf /MEK1 /ERK1/2 Signalweges [25, 100-104]. Die Aktivierung dieser Signalmoleküle führt einerseits zur Hemmung der Apoptose, indem die Caspase-3 Aktivität gesenkt wird und andererseits zur Stimulation der Proliferation der β -Zelle [25, 99, 101, 113].

Da der GLP-1 Rezeptor G_{α_s} -Proteine aktiviert, führt die Bindung von GLP-1 an den Rezeptor zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration. Dadurch wird die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, welche das cAMP response element binding protein (CREB) phosphoryliert. CREB stimuliert die Expression der Signalmoleküle IRS-2 und Bcl-2 sowie die PI3-K. IRS-2 seinerseits aktiviert ebenfalls die PI3-K, was zur Stimulierung der Proteinkinase C- ξ und Akt führt [96,104,106]. Dadurch wird u.a. der für die β -Zellproliferation, β -Zellneogenese und Insulingenexpression essentielle Transkriptionsfaktor PDX-1 (pancreatic-duodenum homeobox-1) aktiviert [19, 97, 107]. Das aktivierte Akt stimuliert seinerseits wieder CREB und andere Signalmoleküle, infolgedessen wird die β -Zellproliferation stimuliert und die β -Zellapoptose gehemmt. PI3-K hemmt darüber hinaus die Caspase-3 Aktivität und inhibiert dadurch die β -Zellapoptose [104].

Weitere wichtige Signalmoleküle, welche bei der β -Zellproliferationskaskade involviert sind, sind die MAP (mitogen-activated protein) Kinasen p42 und p44, auch als ERK1 und ERK2 bekannt (extracellular signal-regulated kinase). Diese beiden

MAP Kinasen sind in vielen Zellen bei Proliferations-, Differenzierungs- und Adaptationsmechanismen beteiligt [108-110]. Die Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration nach Bindung von GLP-1 an den GLP-1 Rezeptor führt zur Aktivierung der PKA und zur Aktivierung des Guanine nucleotide exchange factors (GEF). Daraufhin wird die Ras/ Raf/ MEK1 Signalkaskade aktiviert. MEK1 phosphoryliert ERK1/2 an den Tyrosin-Threoninresten (Y202/T204), ERK1/2 wird dadurch aktiviert [99, 103, 110, 111, 112]. Im Zellkern phosphorylieren und induzieren die aktivierten ERK1/2 den für die β -Zellfunktion wichtigen Transkriptionsfaktor PDX-1 [113]. ERK1/2 kontrollieren darüber hinaus die Phosphorylierung und Proteinexpression von CREB [99], welches wie bereits beschrieben eine wesentliche Rolle bei der Proliferation der β - Zelle spielt (Abb. 1-4).

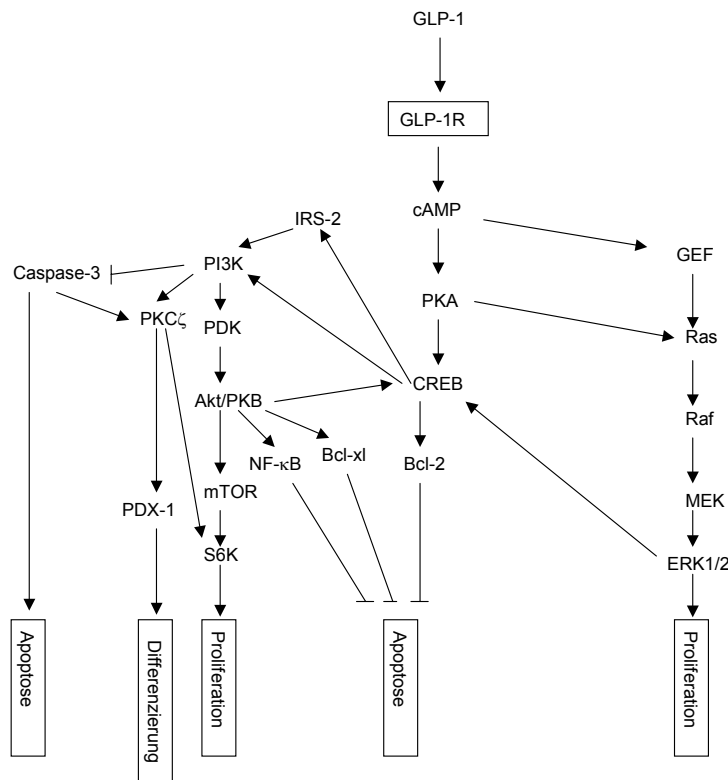


Abb. 1-4 Schematisches Modell der GLP-1 Signaltransduktion, die die Proliferation, Apoptose und Differenzierung in β - Zellen beeinflusst. Modifiziert nach List et al. [104]. GLP-1R, GLP-1 Rezeptor; IRS-2, Insulin receptor substrate-2; GEF, Guanine nucleotide exchange factor; PI3-K, Phosphatidylinositol-3 Kinase; PKC ζ , atypische Proteinkinase C- ζ ; PDK, Phosphoinositide-dependent Kinase; PKA, Proteinkinase A; Akt/PKA, c-Akt/Proteinkinase B; CREB, cAMP response element binding protein; mTOR, mammalian target of rapamycin; MEK, mitogen-activated kinase Kinase; PDX-1, pancreatic duodenal homeobox protein-1; S6K, p70S6 Kinase; ERK, extracellular signal-regulated Kinase

Über die zellulären Mechanismen, die bei Proliferation und Apoptose von L-Zellen eine Rolle spielen, ist bisher wenig bekannt. Hinsichtlich der ERK1/2 und Akt Phosphorylierung wurden in vitro erste Untersuchungen durchgeführt [58, 114]. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation der STC-1 Zellen mit α -Linolensäure ERK1/2 und Akt phosphoryliert werden und dass die Caspase-3 Aktivität dadurch gesenkt wird [114]. Es wird angenommen, dass die langkettigen freien Fettsäuren an GPR120 binden und daraufhin die beiden folgenden unabhängigen Signaltransduktionswege aktiviert werden, der Ras/ Raf/ MEK/ ERK1/2 Signaltransduktionsweg und der PI3-K/ Akt Signaltransduktionsweg (vgl. oben).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

In den L-Zellen des Darms und in den β -Zellen im Pankreas sind eine Reihe G-Protein gekoppelter Rezeptoren exprimiert. In der β -Zelle verstärken mehrere G-Protein gekoppelte Rezeptoren die glukoseinduzierte Insulinsekretion und beeinflussen weitere Zellfunktionen wie die Zellproliferation und -apoptose. Die Rolle der in den L-Zellen exprimierten G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist bisher nur ansatzweise verstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression und Lokalisation ausgewählter G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) in den L-Zellen im Darm und in den β -Zellen im Pankreas zu untersuchen. Darüber hinaus wurde die Funktion dieser GPCRs und die dadurch induzierten Signaltransduktionskaskaden bei der GLP-1 Sekretion aus L-Zellen und bei der Insulinsekretion aus β -Zellen charakterisiert. Ziel der Studien war ferner, den Einfluss dieser GPCRs auf weitere Signaltransduktionswege und deren funktionelle Konsequenzen in diesen Zellen zu untersuchen. Diese Fragestellungen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit molekularbiologisch, immunochemisch, proteinchemisch und pharmakologisch bearbeitet.

Ziel der Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der Bedeutung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und deren Signaltransduktion für die Funktion der L- und β -Zelle zu leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

2.1.1 Chemikalien

Ampizillin	Sigma Aldrich, Steinheim
Bovine Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Kalziumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Collagenase (from <i>Cl.histolyticum</i> lyophil, 0,98 PZ U/mg)	Serva, Heidelberg
D-Glukose	Sigma Aldrich, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim
Docosahexaensäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Exendin 4	Biotrend, Köln
Formalin	Carl Roth, Karlsruhe
Forskolin	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerol	Serva, Heidelberg
Goat Serum	Sigma Aldrich, Steinheim
HBSS (Hank's buffered salt solution)	Invitrogen, Karlsruhe
Hepes	Invitrogen, Karlsruhe
Histopaque [®] -1077 (Ficoll)	Sigma Aldrich, Steinheim
IFN- γ	Roche, Mannheim
IL-1 β	Sigma Aldrich, Steinheim
Insulin	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Griesheim
Milchpulver	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumbicarbonat	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Carl Roth, Karlsruhe

Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich, Steinheim
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich, Steinheim
Nuclease-free H ₂ O	Promega, Mannheim
Ölsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Palmitinsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
PBS (Phosphate-buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe
Pentobarbital	Sigma Aldrich, Steinheim
Ponceau-S-Lösung	Sigma Aldrich, Steinheim
PNPP (4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate)	Sigma Aldrich, Steinheim
Probenecid	Sigma Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma Aldrich, Steinheim
Staurosporin	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris)	Sigma Aldrich, Steinheim
Triton-X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
TNF- α	Roche, Mannheim
Tween-20	Sigma Aldrich, Steinheim
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe
α -Linolensäure	Sigma Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim

2.1.2 Laborgeräte

ABI Prism 7000Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Analysenwaagen: sartorius analytic	Sartorius, Göttingen
BioPhotometer eppendorf	eppendorf, Hamburg
Brutschränke	Heraeus, Hanau
CASY [®] Cell Counter+ Analyse System, Modell TTC	Schärfer System GmbH, Reutlingen
Dampfgarer	Braun, Kronberg
Entwässerungsvorrichtung, Sakura Tissue Tek [®] VIP [™]	Sysmex Digitana AG, Schweiz
Eppendorf-Zentrifuge 5415D (nicht kühlbar)	eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Zentrifuge 5417R (Kühlzentrifuge)	eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Zentrifuge 5810R (Kühlzentrifuge)	eppendorf, Hamburg
FastPrep (Savant, Typ 120 Bio 120 Corp.)	GMI, USA
FLIPR ^{TETRA}	Molecular Devices, München

Fuji LAS 3000 Imaging station	Fuji Photo Film Co., Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop AxioPlan	Carl Zeiss, Göttingen
Fusion- α	Perkin Elmer, USA
Heidolph Titramax 101	Heidolph, Kelheim
Heraus Sepatech Suprafuge 22 (Kühlzentrifuge)	Heraeus, Hanau
Leitz Diavert-inverses Mikroskop	Leitz Wetzlar GmbH, CA
Mix Mate	eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Schott, Mainz
Power Pac 2000	BioRad, München
Schlittenmikrotom	Leica, Nussloch
Schüttelinkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Spektra Max Gemini XS	Molecular Devices, München
Spektra Max Plus 384	Molecular Devices, München
Thermomixer 5436 eppendorf	eppendorf, Hamburg
TopCount NXT	Canberra Packard, Schwadorf, A
Universalwaage: sartorius universal	Sartorius, Göttingen
UV-Lampe und Kamera für Gelfotographie	MWG Biotech, Ebersberg
Victor ² Multilabel HTS Counter	Perkin Elmer, USA
Vortex Genic 2 TM	Scientific Industries, USA
Whatman Biometra: T-Gradient	Biometra, Göttingen
Xcell SURELOCK Mini Cell Power Pac	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 Sonstige Materialien und Reagenzien

Antioxidanz	Invitrogen, Karlsruhe
BD Pharmingen Retrievalgen A (pH 6,0)	BD Biosciences, Heidelberg
Biorad Protein Assay Reagenz	Bio-Rad, München
Blotzelle inklusive Pads	Invitrogen, Karlsruhe
Blue Juice Gel Loading (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Complete Mini-Tabletten Proteaseinhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
dNTP Mix	Sigma Aldrich, Steinheim
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe
D-PBS (Dulbecco`s Phosphate buffered Saline)	Cambrex, Belgien
ECL Entwicklungslösungen	Amersham Biosciences, Freiburg
Einfrierbehälter	Nunc, Wiesbaden

E-Gel (1,2% Agarose)	Invitrogen, Karlsruhe
E-Gel (2% Agarose)	Invitrogen, Karlsruhe
Fast Prep Lysing Matrix I	Q-Biogene, Heidelberg
Fast Prep Lysing Matrix D	Q-Biogene, Heidelberg
Filterpapier	Invitrogen, Karlsruhe
Genitacin	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base)	Invitrogen, Karlsruhe
Nitrocellulosemembran	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage Bis-Tris Gel Gradienten Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Objektträger SuperFrost Plus	Carl Roth, Karlsruhe
One Shot™ TOP10 E.coli kompetente Zellen	Invitrogen, Karlsruhe
Optival adhesive cover	Applied Biosystems, USA
Pap Pen	Dako, Hamburg
pcDNA3.1/V5-His TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
Rainbow-Marker	Amersham Biosciences Freiburg
Ready Load 1 Kb PLUS DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen, Hilden
RotiStore	Carl Roth, Karlsruhe
Thermo Fast 96 Well, semi skirted	Applied Biosystems, USA
Trypsin	Boehringer-Mannheim, Mannheim
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Sorvall, Dreieich
UltraCruz™ Mounting Medium	Santa Cruz, Heidelberg
[2- ¹⁴ C] Thymidine	Amersham Biosciences Freiburg

2.1.4 Kits (kommerzielle Reagenziensätze)

Folgende kommerzielle Reagenzansätze wurden in der vorgelegten Arbeit verwendet:

Name	Verwendung	Quelle
AlphaScreen® SureFire™ Cellular	Messung der ERK1/2 Phosphorylierung	Perkin Elmer, USA
EndoFree Plasmid Kit von QIAGEN	Plasmid DNA Maxipräparation	Qiagen, Hilden
FLIPR® Membrane Potential Assay Kit	Messung der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration	Molecular Devices, München
Glucagon-like peptide-1 (active) ELISA Kit	Messung von GLP-1 in Überständen von Zellen und Rattenkolonstücken	Linco, USA
High Capacity cDNA Archive Kit	Reverse Transkription von RNA	Applied Biosystems, USA
IP-one Kit	Bestimmung von intrazellulär generiertem IP ₁	Cisbio, Frankreich
pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Cloning Kit	Klonierung von hGPR120 in pcDNA3.1/V5-His	Invitrogen, Karlsruhe
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung des hGPR120 PCR-Produktes	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep	Plasmid DNA Minipräparation	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit (250)	Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set (50)	Verdauung von DNA bei der Gewinnung von RNA	Qiagen, Hilden
Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit	Messung von Insulin in Überständen von Zellen und primär isolierten Inseln	Crystal Chem Inc., Downers Grove IL

2.1.5 Enzyme

Name	Verwendung	Quelle
AmpliTaQ® DNA Polymerase	PCR	Perkin Elmer, USA
AmpliTaQ® Gold DNA Polymerase	TaqMan, quantitative RT-PCR	Applied Biosystems, USA
E.coli RNase H	Verdau von RNA in DNA-Präparation	Qiagen, Hilden
AccuPrime Pfx DNA Polymerase	PCR unter Verwendung von 10x AccuPrime Pfx Reaction Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Bgl II	Testverdau unter Verwendung von Puffer D	Promega, Mannheim
Multiscribe Reverse Transcriptase	Reverse Transkription von RNA	Applied Biosystems, USA

2.1.6 Antikörper

Antikörper, die im Western Blot verwendet wurden:

Name	Verdünnung	Quelle
anti-Glucagon, monoclonal, human	1:4000	Sigma Aldrich, Steinheim
anti-GLP-1, monoclonal, Maus	1:1000	Acris, Hiddenhausen
anti-GPR40, polyclonal, human	1:400	Acris, Hiddenhausen
anti-GPR119, polyclonal, Maus	1:400	Eurogentec, Belgien
anti-GPR120, polyclonal, human	1:400	Acris, Hiddenhausen
anti-cleaved Caspase-3, polyclonal, human, Ratte, Maus	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
anti-GPR40, polyclonal, human	1:1000	Acris, Hiddenhausen
anti-GPR119, polyclonal, Maus	1:1000	Eurogentec, Belgien
anti-GPR120, polyclonal, human	1:1000	Acris, Hiddenhausen
anti-Insulin, polyclonal, human	1:400	Acris, Hiddenhausen
anti-Maus IgG*Alexa 488	1:200	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Meerschweinchen IgG*Alexa 488	1:200	Invitrogen, Karlsruhe
anti-Kaninchen IgG*Cy3	1:400	Jackson Laboratories, USA

Antikörper, die in den Immunfluoreszenzexperimenten eingesetzt wurden:

Name	Verdünnung	Quelle
anti- β -Aktin, polyclonal, Ratte	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Akt, polyclonal, human	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
anti-phospho (Ser ⁴³⁷)-Akt, polyclonal, human	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
anti-ERK1/2, polyclonal, human	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
anti-phospho (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)-ERK1/2, polyclonal, human	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
anti-cleaved Caspase-3, polyclonal, human, Ratte, Maus	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
anti-GPR40, polyclonal, human	1:1000	Acris, Hiddenhausen
anti-GPR119, polyclonal, Maus	1:1000	Eurogentec, Belgien
anti-GPR120, polyclonal, human	1:1000	Acris, Hiddenhausen
anti-rabbit IgG*POI	1:5000	Jackson Laboratories, USA

2.1.7 Primer

Sequenzspezifische Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) erworben.

Bezeichnung	Sequenz [5'-.....-3']	T _a [°C]	Verwendung
hGPR120-2f(com)	GCT GTG ACT CTG AAC CTA GAG C	61,4	PCR
hGPR120-2r(com)	GTA GGT GTC ACC ACT GTG TTA GC	51,2	PCR
T7 ("upstream")	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	53,2	PCR
BGH ("downstream")	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	56,0	PCR
hs_GPR40_FP1	GGT CAC CAG CGG ATT AAG CA	59,4	SYBR Green
hs_GPR40_RP1	AAT CTA GGA GGC TCC TGG CG	61,4	SYBR Green
mm_rn_GPR40_FP1	CCT GCC CGT CTC AGT TTC TC	61,0	TaqMan/ SYBR Green
mm_rn_GPR40_RP1	CAC ATA GCA GAA GGC AGT GAT GA	62,1	TaqMan/ SYBR Green
hs_GPR119_FP1	TGT CAC CTC TAC CTA GTG CTG GAA	62,7	SYBR Green
mm_rn_GPR119_FP1	TTG GAG TTG GCA ACT CCC TICT	62,1	TaqMan/ SYBR Green
GPR119_RP1	CGA ACC TCC CTC TGC CAA TA	59,4	TaqMan/ SYBR Green
hGPR120-1FP1	GCT CTG CCT CTC TGC GTC TT	61,4	SYBR Green
hGPR120-1RP1	CAA ATC AGT GTG CAA ATC GAA ATT	55,9	SYBR Green
mm_r_GPR120-FP1	ACG CTC TTC CTG CTC ATG GTT	61,4	TaqMan/ SYBR Green
mm_r_GPR120-RP1	TCA AGA TGA GGA GGA TGG TGA TG	60,6	TaqMan/ SYBR Green
GAPDH-FP	TGG CAT GGA CTG TGG TCA	50,1	TaqMan/ SYBR Green
GAPDH-RP	GCA CCA CCA ACT GCT TAG C	53,1	TaqMan/ SYBR Green

T_a: Annealingtemperatur

2.1.8 Sonden

Bezeichnung	Sequenz [5'-.....-3']	T _a [°C]
mm_rn_GPR40_TP1	C ACA CTC CAG GCI C	66,0
GPR119_TP1	ACC CAC TCA TCT ATG	66,1
mm_r_GPR120-TP	TTC TTC ATC ATG TGG AGT CC	66,0
GAPDH-TP	CAT GGA TGA CCT TGG CCA G	53,1

2.1.9 Zelllinien

STC-1 Zellen

Bei den STC-1 Zellen handelt es sich um eine immortalisierte Mauszelllinie aus endokrinen Tumoren des Dünndarms. Die Zelllinie wurde von Dr. Hanahan (New England Center, Boston, MA) bereitgestellt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Das verwendete RPMI 1640 Medium (11,1 mM Glukose, Invitrogen) wurde mit 5% fötalem Kälberserum (FKS) versetzt. Es handelt sich um eine adhärent wachsende Zelllinie. Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche im Verhältnis 1:7 passagiert.

NCI-H716 Zellen

Diese humane Zelllinie stammt aus einem Adenocarcinom aus dem Kolon. Dabei handelt es sich um undifferenzierte Zellen, die bei Kultivierung auf Matrigel zu endokrinen Zellen ausdifferenzieren können. Die Zelllinie stammt von ATCC (Deutschland, Wesel). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 25 mM Glukose, Invitrogen), versetzt mit 10% FKS, kultiviert. Bei den Zellen handelt es sich um Suspensionszellen. Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche im Verhältnis 1:8 passagiert.

INS-1E Zellen

INS-1E Zellen sind Ratteninsulinomazellen und wurden aus INS-1 Zellen subkloniert. Die Zelllinie stammt von Prof. Dr. Wollheim (Department of Medicine, Division de Biochemie Clinique, Genf, Schweiz). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Das verwendete RPMI 1640 wurde mit 5% FKS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 10 mM HEPES und 1 mM Natriumpyruvat versetzt. Es handelt sich um eine adhärenz wachsende Zelllinie. Die Zellen wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:5 passagiert.

Min6c4 Zellen

Bei der Min6c4 Zelllinie handelt es sich um einen Subklon der murinen Min6 Insulinomazelllinie. Diese Zellen stammen von Dr. Miyazaki (Osaka, Japan) und wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank in DMEM, versetzt mit 10% FKS und 50 µM β-Mercaptoethanol, kultiviert. Die Zellen wurden einmal pro Woche im Verhältnis 1:6 passagiert und wachsen adhärenz.

1321N1 Zellen

1321N1 Zellen sind humane Astrozytenzellen und wurden von der Firma Euroscreen (Brüssel, Belgien) bezogen. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Das verwendete DMEM wurde mit 10% FKS versetzt. Es handelt sich um eine adhärenz wachsende Zelllinie. Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche im Verhältnis 1:8 passagiert.

1321N1/hGPR40 und hGPR120 Zellen

Bei diesen beiden Zelllinien handelt es sich um 1321N1 Zellen, die stabil mit hGPR40 und hGPR120 transfiziert wurden. Die 1321N1/hGPR40 Zellen (GPR40-C1) wurden von der Firma Euroscreen bezogen, die 1321N1/hGPR120 Zellen

wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert. Beide Zelllinien wurden in DMEM, versetzt mit 10% FKS und 0,4 mg/ml Geneticin, kultiviert. Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche im Verhältnis 1:8 passagiert.

Die Trypsinierungszeit für die adhärenenten Zellen lag zwischen zwei und drei Minuten.

2.1.9 Medien und Puffer

Name	Quelle
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Cambrex, Belgien
RPMI 1640	Cambrex, Belgien
Fötales Kälberserum (FKS)	Biological Industries, Israel
10x PCR Buffer	Perkin Elmer, USA
TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix	Applied Biosystems, USA
ABsolute QPCR SYBR Green Mixes	Applied Biosystems, USA
LB (Luria Broth)-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
10x AccuPrime Pfx Reaction Mix	Invitrogen, Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage MES Running Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage Transferpuffer	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.10 Zellkulturmaterialien

Name	Quelle
Mikroplatten unterschiedlicher Well-Größe	Costar, Bodenheim
Poly-D-Lysine, 384-well black/clear plate	Becton Dickinson, Heidelberg
384-well plate, clear, no-treated, no lid	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschälchen 60 mm	Nunc, Wiesbaden
CulturePlates white, 384-well	Perkin Elmer, USA
384-well plate, white, TC	Greiner, Flacht
Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System	Nunc, Wiesbaden
Cytostar-T™ 96-well scintillating microplates	Amersham, Freiburg
CryoTubes™ CryoLine™ System	Nunc, Wiesbaden

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Reverse Transkription

Die Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben wurde mit Hilfe der reversen Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Durchgeführt wurde die RT mit Hilfe des High Capacity cDNA Archive Kits wobei 2 µg Gesamt-RNA in der Reaktion eingesetzt wurden.

Die RNA-Proben wurden mit H₂O gemischt, so dass in 10 µl Probe 2 µg RNA enthalten waren. Zu jeder Probe wurden 10 µl MasterMix (10x RT buffer, 10x Random Primers, 25x dNTP- mixture, Multi Scribe RT (50U/ µl)) zugegeben und 10 min bei 25°C inkubiert und anschließend 2 h bei 37°C inkubiert.

2.2.2 PCR

Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) wird für die Amplifizierung beliebiger DNA-Fragmente (Template) eines bestimmten Genabschnittes eingesetzt. In den PCRs wurde meist die AmpliTaq[®] DNA Polymerase verwendet. Diese Polymerase ist eine modifizierte Form der *Thermus aquaticus* DNA Polymerase, deren optimale Aktivität zwischen 55 und 75°C liegt. Eine weitere Polymerase, die verwendet wurde, um die cDNA eines vollständigen Gens zu amplifizieren, war die AccuPrime Pfx DNA Polymerase. Diese Polymerase hat die Besonderheit, dass sie eine Proofreadingaktivität hat, sowie eine Exonukleaseaktivität besitzt. Ihre optimale Aktivität liegt ebenfalls zwischen 55°C und 75°C. Die Primer wurden von MWG (Ebersberg) synthetisiert und in der PCR in einer Konzentration von 0,4 µmol/l eingesetzt.

Es wurden 100 ng cDNA aus Zellen bzw. Gewebe und 24 µl Master-Mix (je Probe 19,5 µl Nuclease-free H₂O; 2,5 µl 10x PCR- Puffer; 0,5 µl dNTP-Mix; 0,5 µl Forward und Reverse Prime; 0,5 µl AmpliTaq[®] DNA Polymerase bzw. AccuPrime Pfx DNA Polymerase) gemischt.

Die PCR-Produkte wurden anschließend in einer Agarose-Gelelektrophorese mit einem Größenstandard überprüft.

2.2.3 Real-Time-PCR (SYBR Green)

Die SYBR Green Real-Time-PCR ist eine PCR-Methode, die zusätzlich die Möglichkeit einer Templatequantifizierung bietet. Bei dieser PCR wird neben dem

genspezifischen Primerpaar ein SYBR Green Farbstoff, ein asymmetrischer Cyan-Farbstoff, zugegeben, der an doppelsträngige DNA bindet. Daraus resultiert ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, der blaues Licht bei einer Wellenlänge von 498 nm absorbiert und grünes Licht bei einer Wellenlänge von 522 nm emittiert. Somit korreliert die Zunahme der GOI (Gene of interest)-DNA während der PCR mit der Zunahme der Fluoreszenz von PCR-Zyklus zu PCR-Zyklus.

Zur Quantifizierung wird der sog. C_T -Wert herangezogen, der Fluoreszenzschwellenwert (Threshold Cycle). Der C_T -Wert charakterisiert den PCR-Zyklus, bei dem das emittierte Licht erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt (exponentielle Amplifikationsphase).

Mit Hilfe einer Standardkurve (erstellt durch den Einsatz bekannter Templatemengen) kann schließlich eine quantitative Aussage über die Expression des GOI gemacht werden. Um eine vergleichbare Aussage über die Expression des GOI machen zu können, wird eine relative Quantifizierung mit Hilfe einer endogenen Kontrolle (GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) durchgeführt.

Die Real-Time-PCR wurde durchgeführt, um eine quantitative Aussage über die Expression unterschiedlicher G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) in Zellen machen zu können.

Zu 0,5 μ l cDNA jeder Probe wurde 3,5 μ l H₂O und 6 μ l des MasterMixes pipettiert (pro Probe 0,6 μ l Nuclease-free H₂O; 5 μ l Absolute QPCR SYBR Green Mix sowie 0,2 μ l der beiden Primer (10 μ mol/l)). Als Polymerase wurde die AmpliTaq[®] Gold Polymerase, die bereits im SYBR Green Mix enthalten ist, eingesetzt. Diese Polymerase hat eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, notwendig für die Hydrolyse der Sonde, aber keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Für alle Proben wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die PCR wurde im ABI Prism 7900 Sequence Detection System durchgeführt.

2.2.4 Real-Time-PCR (TaqMan)

Die TaqMan Real-Time-PCR dient ebenfalls einer quantitativen Expressionsbestimmung eines bestimmten Gens. Außer dem genspezifischen Primerpaar wird in dieser PCR eine spezielle fluorogene Sonde zur Probe zugegeben, welche sich zwischen dem Primerpaar am Template anlagert. Diese Sonde (Oligonukleotid) wird am 5'-Ende mit dem sog. Reporterfarbstoff (FAM= 6-Carboxyfluorescein bzw. VIC= Fluoreszenzfarbstoff, Eigenentwicklung von Applied Biosystems) und am 3'-Ende mit dem sog. Quencherfarbstoff (TAMRA= 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamine) markiert. Wird die Sonde bei einer spezifischen

Wellenlänge (480 nm) angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes in räumlicher Nähe vom Quencherfarbstoff durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt, d.h. das emittierte Licht des Reporterfarbstoffes regt den Quencherfarbstoff zur Emission an, wodurch nur das emittierte Licht des Quencherfarbstoffes gemessen werden kann. Diese Emissionswellenlänge wird als Hintergrundemission gemessen. Während der PCR wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq[®] Polymerase hydrolysiert. Dadurch entfernt sich der Reporterfarbstoff räumlich vom Quencherfarbstoff und die Reporteremission kann detektiert werden. Mit zunehmender Zyklenzahl nimmt die Zahl der Amplikons zu und damit auch das Signal des Farbstoffs.

Zur Quantifizierung wird auch hier der C_T-Wert herangezogen, der den PCR-Zyklus charakterisiert, bei dem die Hintergrundfluoreszenz (Hintergrundemission) des Quencherfarbstoffes signifikant durch die Reporterfluoreszenz überstiegen wird (exponentielle Amplifikationsphase).

Mit Hilfe einer Standardkurve wurde auch hier die Quantifizierung des GOI vorgenommen und mit Hilfe von GAPDH als endogene Kontrolle relativ quantifiziert. Die TaqMan Real-Time-PCR wurde durchgeführt, um eine quantitative Aussage über die Expression unterschiedlicher G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) in Geweben machen zu können. Die TaqMan-Primer wurden von MWG synthetisiert, die nötigen Sonden (TP (Taqman Probe) der GPCRs (markiert mit FAM und TAMRA) und von GAPDH (gelabelled mit VIC und TAMRA)) wurden von Applied Biosystems synthetisiert.

Zu 0,5 µl cDNA jeder Probe wurde 3,5 µl H₂O und 6 µl des MasterMixes zupipettiert (pro Probe 0,4 µl Nuclease-free H₂O; 5 µl 2x PCR Master Mix (TaqMan[®] Universal PCR Master Mix); 0,2 µl der beiden Primer (10 µmol/l) sowie 0,2 µl der TaqMan-Sonde (5 µmol/l)). Als Polymerase wurde ebenfalls die AmpliTaq[®] Gold Polymerase, die bereits im MasterMix enthalten ist, eingesetzt.

Die PCR wurde im ABI Prism 7900 Sequence Detection System durchgeführt.

2.2.5 Klonierung

Zur Klonierung des humanen GPR120 wurde das Template zunächst in der humanen NCI-H716 Zelllinie und humaner Dünndarm cDNA (Clontech) mit Hilfe der AccuPrime Pfx DNA Polymerase amplifiziert und anschließend mit der AmpliTaq Polymerase (2.5 U/ Ansatz; 0.05 U/ µL) behandelt (10 min bei 72°C), um einen 3' A-Überhang an das Template anzufügen. Dieser Überhang war für die folgende Klonierung notwendig. Das Template wurde anschließend mit Hilfe des QIAGEN

QIAquick PCR Purification Kit nach dem Protokoll der Firma Qiagen (QIAGEN® QIAquick PCR Purification Kit Handbook) aufgereinigt.

Anschließend wurde das aufgereinigte Template unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kits in das Expressionsplasmid pcDNA3.1/V5-His kloniert. Dieses Expressionsplasmid (Vektor) liegt linear vor und die Besonderheit liegt in einem 3'-T Überhang, welcher die Ligation mit dem PCR-Produkt, das den durch die Taq Polymerase angehängten 3'-A Überhang besitzt, ermöglicht. Die 3'-T-Überhänge des linearisierten Vektors sind kovalent an die Topoisomerase I aus Vaccinia Virus gekoppelt. Die OH-Gruppe des 3'-A Überhanges des PCR-Produktes greift diese Bindung zwischen Vektor und Enzym an, so dass die Topoisomerase freigesetzt wird und das PCR-Produkt in den Vektor ligiert wird. Dadurch wird eine effiziente Ligation mit dem PCR-Produkt in sehr kurzer Zeit ermöglicht.

Es wurden 1 µl Salt Solution®, 4 µl des PCR-Produktes und 1 µl des pcDNA3.1/V5-His Vektors miteinander vermischt und 30 min bei RT inkubiert, anschließend wurde das Gemisch kurz anzentrifugiert und zur Beendigung der Reaktion auf Eis gestellt.

2.2.6 Transformation

Ziel der Transformation ist die Vermehrung einer bestimmten DNA-Sequenz (GOI), eingebaut in einen Expressionsvektor, in Bakterienzellen.

Transformiert wurden kompetente E.coli Bakterienzellen (One Shot™ TOP 10 E.coli kompetente Zellen) mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His hGPR120. Es wurden 2 µl des TOPO-Cloning Reaktionsansatzes (vgl. 2.1.4) zu den kompetenten Zellen (50 µl) gegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde in einer Hitzeschockreaktion (30 sec bei 42 °C) die Transformation hervorgerufen. Die Probe wurde anschließend sofort auf Eis gestellt und 2 min inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 250 µl SOC-Medium.

Dieser Transformationsansatz wurde daraufhin 1 h bei 37 °C in LB-Medium (Luria Broth Medium) mit Antibiotikum geschüttelt. Da der Expressionsvektor ein Ampizillinresistenzgen enthält, wurde Ampizillin als zugesetztes Antibiotikum gewählt. Von diesem Transformationsansatz wurden 50 µl und 100 µl auf vorgewärmte LB-Amp-Agar-Platten (37°C) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden Einzelkolonien gepickt und zunächst in einer Vorkultur 7 h in 5 ml LB-Medium im Schüttler bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden in einer Minikultur 100 µl in 10 ml LB-Medium 15 h im Schüttler inkubiert (37 °C; 180 rpm). Von den Minikulturen wurden Einfrierstocks entnommen (500 µl in Roti®-Store cryo vials; Lagerung: -80 °C). Mit der Minikultur

wurde anschließend eine Mini-Präparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach Anweisung des Herstellers Qiagen durchgeführt (QIAprep Miniprep Handbook: For purification of Plasmid DNA: QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol using a vacuum manifold; March 2002), um das Expressionsplasmid in hoher Reinheit zu gewinnen. Die Ausbeute des Expressionsvektors wurde mit Hilfe des BioPhotometers bei einer Extinktion von 260 nm bestimmt.

2.2.7 Restriktionsanalyse

Um zu überprüfen, ob das Template in den Expressionsvektor korrekt eingebaut wurde, wurde ein Testverdau durchgeführt. Eingesetzt wurde das Restriktionsenzym Bgl II (Puffer D). Zu 500 ng Plasmid-DNA (gesamt 17 µl cDNA in Nuclease-free H₂O) wurde 1 µl Enzym und 2 µl Puffer D pipettiert, bei 37 °C 1,5 h inkubiert und danach zur Überprüfung eine Gelelektrophorese (2% Agarose) durchgeführt.

2.2.8 Maxipräparation

50 bzw. 100 µl eines Einfrierstocks der pcDNA3.1/5V-His hGPR120-Minikulturen wurden in 100 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Von diesen Maxikulturen wurden 500 µl-Einfrierstocks eingefroren.

Im Folgenden wurde eine Maxipräparation nach dem Protokoll der Firma Qiagen durchgeführt (QIAGEN® Plasmid Purification Handbook: For purification of ultrapure plasmid DNA: Plasmid or Cosmid DNA Purification Using the EndoFree Plasmid Maxi Kit, August 2003). Die Ausbeute des Expressionsvektors wurde mit Hilfe des Bio Photometers bei einer Extinktion von 260 nm bestimmt.

Der Expressionsvektor wurde anschließend in der Transfektionsreaktion eingesetzt.

2.2.9 Sequenzierung

Um sicherzustellen, dass das gewünschte Gen in den Expressionsvektor eingebaut wurde, wurden die isolierten Plasmide zweier Expressionsklone von der Firma MWG mit entsprechenden Primern sequenziert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Zentrifugation von Zellen

Für die Zentrifugation der Zellen wurde eine Heraeus-Zentrifuge (Megafuge 2.0R) verwendet. Die Zellen wurden bei 1000 rpm und 22°C für 5 min abzentrifugiert.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des CASY® Cell Counters bestimmt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension in 10 ml CASYTON® aufgenommen und mit Hilfe des Cell Counters (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) gezählt.

Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden aus 80% konfluenten Zellkulturflaschen abgelöst und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in FKS, versetzt mit 10% DMSO resuspendiert, die Zellsuspension in 2 ml Kryoröhrchen überführt und sofort bei -80°C 24 h im Isopropanol-gefüllten Einfrierbehälter (nunc) eingefroren.

Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen für eine dauerhafte Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Auftauen von Zellen

Die Zellen, eingefroren in Kryoröhrchen, wurden bei 37°C rasch aufgetaut und die Zellsuspension anschließend in ein 15 ml Röhrchen, welches das für die Zellen geeignete Kulturmedium enthielt, überführt. Nach Zentrifugation und Resuspendieren der Zellen in 10 ml Kulturmedium wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde ein Medienwechsel durchgeführt.

2.3.2 Transfektion

Unter Transfektion versteht man die Einschleusung rekombinanter DNA in Empfängerzellen.

Transfiziert wurden 1321N1 Zellen mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His hGPR120 mit Hilfe von Lipofectamine™ 2000.

Bei dieser Methode werden Liposomen in Form eines lyophilisierten Lipidfilms mit dem Expressionsvektor vermischt, zu den Zellen in serumfreiem DMEM zugesetzt und 5 h inkubiert. Währenddessen fusionieren die Liposomen-Expressionsvektor-Komplexe mit der Zellmembran der Säugerzellen und die Plasmid-DNA gelangt in die Zellen. Es wurden 60 µl Lipofectamine™ 2000 in 1,5 ml serumfreiem DMEM 5 min bei RT inkubiert.

Außerdem wurden 24 µg des Expressionsvektors zu 1,5 ml serumfreiem DMEM gegeben. Anschließend wurden die beiden Ansätze miteinander vermischt und 20 min bei RT inkubiert, so dass die Liposomen mit dem Expressionsvektor einen Komplex eingehen konnten.

Die zu 80% konfluenten Zellen wurden mit 10 ml serumfreiem DMEM (37 °C) überschichtet, 3 ml der Transfektionslösung vorsichtig zugegeben und 5 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium durch das Selektionsmedium (Kulturmedium + Resistenzantibiotika) ersetzt.

2.3.3 Selektion von Einzelzellklonen

Die transfizierten genitocinresistenten 1321N1 Zellen wurden 7 Tage nach der Transfektion in 96-well Platten in einer „limited dilution“ ausgesät, d.h. zur Selektion von Einzelklonen wird eine Zelle pro well ausgesät.

Nach 1,5 Wochen wuchsen in diesen 96-well Platten Einzelklone, welche anschließend in Zellkulturplatten unterschiedlicher Größe vermehrt wurden.

2.4 RNA-Isolation

2.4.1 RNA-Isolation aus Zellen

Die Isolation der RNA aus Zellen wurde mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit durchgeführt. Die DNA wurde mit dem Qiagen RNase-Free DNase Set verdaut. Angewandt wurde das Protokoll „RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells, I. Spin Protocol“ (RNeasy Mini Handbook, RNeasy Mini Kit for total RNA isolation from animal cells, June 2001, Qiagen).

Schließlich wurde von der isolierten Gesamt-RNA (eluiert in RNase free H₂O) photometrisch bei 260 nm eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt und die RNA anschließend bei -80°C gelagert.

2.4.2 RNA-Isolation aus Gewebe

Das isolierte Gewebe (Rattenileum und Rattenkolon) wurde zur Stabilisierung der RNA in 1,5 ml RNAlater (Qiagen) aufgenommen und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Für den Gewebeaufschluss, wurde das Gewebe in den Lysepuffer RLT (Qiagen), versetzt mit 1% β -Mercaptoethanol in ein FastPrep Gefäß gegeben, welches eine für Darm entsprechende Matrix enthielt (Matrix D: 1,4 ceramic spheres). Mit Hilfe dieses FastPrep Systems konnte das Gewebe in einer FastPrep (FastPrep 120 Bio 101 Corp.) homogenisiert werden. Anschließend wurde das Homogenat bei 4°C 4 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Isolation der RNA aus dem Überstand wurde anschließend wie in 2.4.1 beschrieben durchgeführt.

2.5 Western Blot Analyse

Zur Untersuchung der Proteinexpression unterschiedlicher G-Protein gekoppelter Rezeptoren und den Signalmolekülen ERK1/2, Akt und Caspase-3 in Zellen und Geweben wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper (AK). Zunächst werden Proteine aus einem Gesamtzelllysate oder Gewebelysate gewonnen und nach Denaturierung in einer eindimensionalen Gelelektrophorese, der sog. SDS-PAGE (Sodium-dodecyl-sulfate Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ihrer Größe nach aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine werden danach durch sogenanntes Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membranen werden anschließend mit den für die Proteine spezifischen Antikörpern (AK) inkubiert, wobei unspezifische Bindungen zunächst durch ein vorhergehendes Abblocken mit Milchproteinen (Magermilchpulver) und Rinderserumalbumin (BSA) unterbunden werden. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wird mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser ist meist enzymkonjugiert und bindet spezifisch an den Primärantikörper. Nach einer enzymatischen Substratreaktion, die zu einem lumineszierenden Endprodukt führt, können die Proteinbanden mit Hilfe eines entsprechenden Lumineszenz-Detektors sichtbar gemacht werden.

2.5.1 Aufarbeitung der Proben und Quantifizierung

Zur Proteingewinnung aus tierischem Gewebe (Rattenkolon und -ileum) wurden ca. 0,5 cm große Gewebestücke, welche in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurden, in Lysepuffer (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5; 100 mmol/l NaCl; 50 mmol/l NaF; 10% Glycerol; 1% Triton; 1 mmol/l DTT; 30 mmol/l PNPP; 10 mmol/l Na-orthovanadat; Proteaseinhibitor complete) in der FastPrep zerkleinert. Dazu wurden FastPrep-Röhrchen mit Lysis Matrix I verwendet. Anschließend wurde das Homogenat bei 4°C, 14000 rpm 10 min zentrifugiert, der Überstand in flüssigen Stickstoff gegeben (dient dem besseren Proteinaufschluss) und nach folgendem Auftauen 5 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert.

Für den immunologischen Nachweis von Proteine aus Zelllinien, wurden diese 1-2 Tage vor dem Versuch in 12-well Platten ausgesät und mit unterschiedlichen Reagenzien behandelt und inkubiert.

Die Zellen wurden zur Proteingewinnung mit dem oben genannten Lysepuffer lysiert, in flüssigen Stickstoff gegeben und nach dem Auftauen wie oben beschrieben, abzentrifugiert.

Nach dem Lyseprozess wurde die Proteinmenge der Proben mittels der Bradfordmethode [115] bestimmt. Dabei handelt es sich um ein photometrisches Verfahren zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen, wobei hauptsächlich die basischen Aminosäurereste der Proteine (< 3000 kDa) bei pH 0-1 einen Komplex mit Coomassie Brilliant-Blue G-250 bilden. Dazu wurde das 5-fach Proteinassay Reagenz von Bio-Rad verwendet. Zur Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit BSA erstellt. Die Proteinproben wurden 1:100 verdünnt, mit dem Proteinassayreagenz versetzt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend wurde photometrisch die Absorption bei 595 nm gemessen.

2.5.2 Protein SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vor der Auftrennung der Proteine der Größe nach wurden die Proteinextrakte mit 4x Sample-Puffer 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proteinextrakte in einem 4-12 %-igen SDS-Gradientengel (NuPage Bis-Tris Gradienten Gele von Invitrogen) aufgetrennt, wobei zwischen 6 und 10 µg Protein aufgetragen wurde. Der Gellauf wurde in einer Elektrophoresekammer (Xcell SUPERLOCK Mini Cell Power Pac von Invitrogen) mit NuPage MES Running Puffer bei 200 V durchgeführt. Parallel zu den Proteinen wurde ein Proteingrößenstandard mitgeführt.

2.5.3 Western Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine erfolgte eine Übertragung derer auf eine Nitrozellulosemembran. Der Blot wurde nach einem „Sandwich-Prinzip“ aufgebaut, zwischen Pads, Whatman-Papier und Membran wurden die Gele in einer Blotzelle eingeklemmt. Dazu wurden die Pads, Whatmanpapiere und die Membranen vor dem Transfer etwa 5 min in Transferpuffer gelegt. Der Transfer wurde mit Hilfe des NuPage Transferpuffers 1 h bei 30 V ebenfalls in der oben genannten Elektrophoresekammer durchgeführt.

Anschließend wurde die Transfereffizienz durch eine Anfärbung der Membran mit Ponceaus überprüft. Die Anfärbung mit Ponceaus macht es möglich, das gleichmäßige Bandenmuster der Proteine auf der Membran zu erkennen. Außerdem dient die Ponceaus Anfärbung der Fixierung der Proteine auf der Membran.

2.5.4 Immundetektion

Zunächst wurden die Membranen bei RT 1 h in Blockierungspuffer (10% Magermilchpulver, 5% BSA in PBS-T) zum Abblocken unspezifischer Bindungen inkubiert. Anschließend wurden die Primärantikörper in einer 5%-igen BSA-PBS-T-Lösung 1:1000 verdünnt und die Membranen 1 h bei RT hybridisiert. Danach wurden die Membranen 3x 10 min mit PBS-T gewaschen und dann mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000), verdünnt in Blockierungspuffer, inkubiert. Durch eine enzymkatalysierte chemische Reaktion der Peroxidase mit lichtemittierenden Substanzen (ECL-System von Amersham), konnten die Proteine anschließend mit Hilfe eines Lumineszenz-Detektors sichtbar gemacht werden (Fuji LAS 3000 Imaging station). Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit der AIDA Image Analyzer Software (Raytest).

2.5.5 Strippen des Blots

Aufgrund gleicher oder ähnlicher Größen zweier Proteine, die auf derselben Membran detektiert werden sollten, mussten die Proteine nacheinander nachgewiesen werden. Nach der Detektion des ersten Proteins, mussten die Antikörper wieder von der Membran entfernt werden, um die Bindung weiterer Antikörper zu ermöglichen. Dazu wurde die Membran 1 h bei 65°C in Stripping-Puffer (62,5 mmol/l Tris-HCl, pH 6,7, 2% (w/v) SDS, 100 mmol/l β -Mercaptoethanol) erhitzt. Danach konnte die Immundetektion des zweiten Proteins durchgeführt werden.

2.6 Ex-vivo Tiermodelle

2.6.1 Isolierung von Darmkolonstücken

Am Vortag der Darmisolation wurden männliche Wistar Ratten (ca. 300 g, Charles River) nüchtern gesetzt, so dass deren Darm am Versuchstag keine bzw. nur noch wenige Kotreste enthielt. Die Tiere wurden mit 50% Narkoren[®] (Pentobarbital, 1:1 in isotonischer Salzlösung verdünnt) (0,1 ml/ 100g Körpergewicht) narkotisiert. Anschließend wurde das Fell mit 70% EtOH getränkt, die äußere Hautschicht (Fell) abgetragen und die Bauchhöhle aseptisch geöffnet. Daraufhin wurde das Darmsystem freigelegt und das Tier durch Aufschneiden des Zwerchfells und durch Durchtrennen des rechten Herzvorhofs getötet. Das Kolon wurde entnommen und in KRBH-Puffer (Krebs-Ringer Bicarbonat Hepes-gepufferte Salzlösung: 140 mmol/l NaCl, 3,6 mmol/l KCl, 0,5 mmol/l NaH₂PO₄, 0,5 mmol/l MgSO₄, 1,5 mmol/l CaCl₂, 10 mmol/l Hepes, 5 mmol/l NaHCO₃) auf Eis für die weiteren Versuche gelegt. Für RNA-Isolationsversuche und Western-Blot Analysen wurden ca. 0,5 cm große Darmabschnitte in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Für GLP-1 Sekretionsversuche wurden ca. 2 cm große Darmstücke zunächst, wenn nötig, sehr vorsichtig von übrigen Kotresten befreit, in 2-4 mm große Stücke geschnitten und anschließend in ein mit kaltem KRBH-Puffer versehenes Eppendorf Röhrchen, welches zuvor gewogen wurde, gegeben. Diese Eppendorf Röhrchen wurden danach noch einmal gewogen, um das Gewicht der Darmabschnitte bestimmen zu können. Die Darmabschnitte wurden anschließend sofort im GLP-1 Sekretionstest eingesetzt.

2.6.2 Isolierung von primären Inselzellen

Wie in 2.6.1 beschrieben wurden männliche Wistar Ratten mit Narkoren[®] narkotisiert und die Bauchhöhle wie beschrieben geöffnet. Anschließend wurden am Ductus choledochus zwischen Leber und Pankreas und an der Papilla duodeni Ligaturen angebracht. Der Ductus choledochus wurde direkt am Duodenum angeschnitten und ein kleiner Schlauch, der mit einer Spritze verbunden war, eingeführt. Zunächst wurde der Ductus choledochus mit wenigen µl Hank's Puffer durchspült. Danach wurde das Tier wie in 2.6.1 beschrieben, getötet. Im Folgenden wurde Kollagenase (1,5 mg/ 10 ml Hank's Puffer), welche immer frisch gelöst wurde, langsam über den Ductus choledochus in den Pankreas injiziert, der

Pankreas frei präpariert und komplett entnommen. Dieser wurde in Hank`s Puffer auf Eis gegeben und sofort weiter verarbeitet.

Der Pankreas wurde zunächst in 40 ml Hank`s Puffer (37°C) gewaschen und 20 min in 10 ml Hank`s Puffer (37°C) in einem 50 ml Falcon verdaut. Der Verdauungsprozess wurde durch 40 ml kalten Hank`s Puffer mit 0,4% BSA gestoppt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (64 g/10 sec) wurden größere, schwimmende Teile von Fettgewebe entfernt, ca. 35 ml Puffer abgesaugt und das Organ mit 3 ml Hank`s Puffer resuspendiert und vorsichtig durch eine Metallkanüle (Schlundsonde) gesaugt, um intakte Stützstrukturen zu zerstören. Nach Zugabe von 35 ml Hank`s Puffer erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (64 g/ 10 sec). Der Überstand wurde abgesaugt und das verbleibende Organhomogenat wurde in 10 ml Hank`s Puffer resuspendiert und durch ein Haushaltssieb, welches zuvor angefeuchtet wurde, filtriert. Das Sieb wurde mehrmals mit Hank`s Puffer nachgespült. Danach erfolgten zwei weitere Zentrifugationsschritte (517 g/ 10 sec und 403 g/ 10 sec). Anschließend wurde der Überstand komplett abgesaugt und das zurückbleibende Pellet in 20 ml Histopaque®-1077 resuspendiert und mit 20 ml Hank`s Puffer überschichtet, um einen diskontinuierlichen Gradienten zu erzeugen. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 1120 g konnten die Inseln aus der Schicht unter der Trennphase abgenommen werden. Durch mehrmaliges Waschen und anschließendem Abzentrifugieren (403 g/ 1 min, 179 g/30 sec, 64 g/30 sec) mit Hank`s Puffer wurde das restliche Histopaque ausgewaschen und schließlich wurden die Inseln in 5 ml Hank`s Puffer aufgenommen und in eine Petrischale überführt.

Schließlich wurden die Inseln unter einem Lichtmikroskop mit einer 20 µl Eppendorf Pipette in RPMI 1640, versetzt mit 5%FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, 50µmol/l β-Mercaptoethanol, 1 mmol/l Na-Pyruvat, 10 mmol/l Hepes transferiert und mehrere Tage kultiviert.

2.7 Sekretionsstudien

2.7.1 Sekretion von GLP-1 in vitro und ex vivo

2.7.1.1 GLP-1 Sekretion aus STC-1 Zellen

STC-1 Zellen wurden in RPMI 1640 (11,1 mmol/l Glukose) in 24-well Platten ausgesät (200.000 Zellen/well) und für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. 12 h vor Versuchsbeginn, wurde das RPMI 1640 Medium durch ein RPMI 1640 Medium ohne Glukose ersetzt. Am Versuchstag wurden die Zellen 2x mit KRBH-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 1 h bei 37°C und 5% CO₂ in KRBH-Puffer ohne Glukose inkubiert. Danach wurden die unterschiedlichen Teststimulantien, gelöst in KRBH-Puffer, zu den Zellen gegeben und 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zu den Stimulantien bzw. zum KRBH-Puffer wurde zusätzlich ein DPP IV (Dipeptidylpeptidase IV) Inhibitor (Ondero[®], Boehringer-Ingelheim) zugegeben (1 µmol/l), da GLP-1 innerhalb weniger Minuten durch dieses Enzym abgebaut und damit nicht mehr nachweisbar wäre.

Nach 2 h wurde der Zellüberstand in eine 96-well Platte übertragen und bei 4000 rpm 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben 1:10 in KRBH-Puffer verdünnt und der GLP-1 Gehalt mit Hilfe eines ELISA's (enzyme linked immuno sorbent assay, Linco) bestimmt. Dabei ist ein Primärantikörper, der spezifisch die N-terminale Region des GLP-1 Peptids bindet, auf einer schwarzen 96-well Platte gebunden. Die verdünnte Probe sowie Standards und Kontrolle werden in die Platte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wird nach mehrmaligem Waschen ein Detection Konjugat zugegeben, das den Sekundärantikörper enthält. Dieser bindet an das vom Primärantikörper gebundene GLP-1 (Sandwich-ELISA Methode). Dieser Sekundärantikörper ist mit einer alkalischen Phosphatase markiert. Nach einer Inkubation von 2 h wird das Konjugat abgewaschen, die Platte mehrmals gewaschen und eine Substratlösung zugegeben. Diese Substratlösung enthält 4-Methylumbelliferylphosphate, welches durch die Phosphatase, die an den Sekundärantikörper gebunden ist, in einer enzymkatalysierten chemischen Reaktion in das fluoreszierende Produkt Umbelliferon umgesetzt wird. Die Menge an generierter Fluoreszenz ist direkt proportional zur Konzentration an GLP-1 in der unbekannt Probe. Das Fluorochrom wird bei 355 nm angeregt und die Fluoreszenz wird bei 460 nm mit Hilfe eines Fluoreszenzreaders gemessen (Gemini).

Zur Untersuchung der Wirkung von Nährstoffen auf die GLP-1 Sekretion, wurden langkettige Fettsäuren und Glukose eingesetzt. Die Fettsäuren wurden zu diesem Zweck in 70%-igem EtOH gelöst, wobei diese Lösungen direkt vor den Versuchen hergestellt wurden, zum einen aufgrund des Oxidationsrisikos der Doppelbindungen der ungesättigten Fettsäuren bei Kontakt mit Luftsauerstoff und zum zweiten aufgrund dessen, dass die Carboxylgruppe der Fettsäuren bei längerer Lagerung in EtOH mit der Alkoholgruppe eine Esterbindung eingehen können, wodurch die Funktionalität der Fettsäuren beeinträchtigt wird. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 100 mmol/l, im Versuch wurden die Fettsäuren in einer Höchstkonzentration von 100 µmol/l eingesetzt, somit betrug die Endkonzentration an EtOH im Versuch noch 0,07 %, was für die Zellen nicht toxisch war.

2.7.1.2 GLP-1 Sekretion aus Rattenkolon

Rattenkolonstücke wurden wie in 2.6.1 beschrieben isoliert und gewogen. Anschließend wurden die Stücke in einer 48-well Platte, die mit Teststimulantien in KRBH-Puffer versehen war, 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, in eine 96-well Platte pipettiert und 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Für die GLP-1 Bestimmung wurden die Proben, Standards und Kontrollen in die, mit Primärantikörper versehene 96-well Platte gegeben und der ELISA wurde wie in 2.7.1.1 beschrieben, durchgeführt. Die gemessene Menge an GLP-1 im Überstand der Rattenkolonstücke wurde danach mit dem Gewicht der einzelnen Kolonstücke in Beziehung gesetzt.

2.7.2 Sekretion von Insulin in vitro und ex vivo

2.7.2.1 Insulinsekretion aus INS-1E und Min6c4 Zellen

Zur Untersuchung der in vitro Insulinsekretion wurden sowohl mit der Ratten Insulinomazelllinie INS-1E als auch mit der murinen Insulinomazelllinie Min6c4 Sekretionsstudien durchgeführt.

Die INS-1E Zellen wurden in RPMI 1640 in 24-well Platten ausgesät (150.000/well) und für 5 d bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Min6c4 Zellen wurden in DMEM in 24-well Platten ausgesät (200.000/well) und für 72 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden am Versuchstag zunächst zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend 2 h in glukosefreiem Vorinkubationsmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Danach wurden die Zellen 2x mit KRBH-Puffer gewaschen und 30 min mit KRBH-Puffer ohne Glukose bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Abnehmen des

Puffer wurden die Teststimulantien in KRBH mit Glukose (entweder niedrig Glukose: 2,8 mmol/l Glukose oder hoch Glukose: 16,7 mmol/l Glukose) zu den Zellen gegeben und 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen, in eine 96-well Platte gegeben und 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proben wurden je nach Glukosekonzentrationen und Zellen verdünnt und mit Hilfe eines ELISA's wurde das ausgeschüttete Insulin bestimmt. Bei dem ELISA handelt es sich ebenfalls um einen Sandwich ELISA. Die Probe wird mit dem Primärantikörper (Meerschweinchen anti-Ratte-Insulin AK) 2 h inkubiert und nach mehrmaligem Waschen wird der Sekundärantikörper zugegeben und 30 min inkubiert. Der Sekundärantikörper ist mit dem Enzym Horse Radish Peroxidase (POX) gelabelt. Als Substrat dient der Peroxidase das 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB). Dieses wird in einer 30-minütigen Inkubationszeit durch die POX katalytisch umgesetzt und es bildet sich eine blaue Lösung. Durch Zugabe der Stop-Solution wird die Enzymreaktion gestoppt und die blaue Lösung wird gelb. Die Absorption wird anschließend bei 460 nm gemessen.

2.7.2.2 Insulinsekretion aus isolierten primären Inselzellen

Die Langerhans'schen Inseln wurden, wie in 2.6.2 beschrieben nach ihrer Isolierung mehrere Tage (2-5) in Kultur gehalten und anschließend in Sekretionsversuchen eingesetzt. Die Inseln wurden zunächst abzentrifugiert und danach in 10 ml KRBH-Puffer mit 2,8 mmol/l Glukose aufgenommen, in eine Petrischale gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ 1 h inkubiert. Danach wurde KRBH-Puffer mit 2,8 bzw. 16,7 mmol/l Glukose in einer 48-well Platte vorgelegt. Die Inseln wurden aus der Petrischale unter dem Lichtmikroskop gepickt, in jedes well wurden 5 Inseln gegeben. Danach wurden die unterschiedlichen Teststimulantien zweifach konzentriert mit 2,8 bzw. 16,7 mmol/l Glukose in KRBH zu den Inseln gegeben. Die Inseln wurden mit den Substanzen und mit 2,8 bzw. 16,7 mmol/l Glukose (vgl. 2.7.2.1) 1 h bei 37°C und CO₂ inkubiert, anschließend wurde der Überstand in eine 96-well Platte überführt und bei 4000 rpm 10 min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Proben 1:5 verdünnt und mittels ELISA der Insulingehalt der jeweiligen Probe bestimmt (vgl. 2.6.2.1).

2.8 Signaltransduktionsmechanismen

2.8.1 IP₁-Generierung in STC-1 Zellen

D-*myo*-Inositol 1,4,5-phosphat (IP₃) wird durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-phosphat innerhalb des G_{αq}-gekoppelten Signaltransduktionsweges gebildet und dann in D-*myo*-Inositoldiphosphat (IP₂) und D-*myo*-Inositolmonophosphat (IP₁) und schließlich in D-*myo*-Inositol abgebaut. Durch die Zugabe von LiCl zu den Zellen kann der Abbau von IP₁ verhindert werden. Somit können intrazelluläre IP₃ Konzentrationen indirekt über die Messung von akkumuliertem IP₁ mit einem HTRF (High performance time resolved fluorometry) IP-One Assay von Cisbio bestimmt werden. Dieser Assay enthält einen Antikörper gegen IP₁, welcher mit einem EuCryptate markiert ist (Anti-IP₁ Cryptat) und IP₁, das mit einem Farbstoff markiert ist (IP₁-d2 Konjugat). Bindet der Antikörper an das markierte IP₁, so führt dies zu einem Energietransfer von dem Eu Cryptate auf den Farbstoff (FRET= Fluorescence Resonance Energy Transfer). Dadurch kommt es zu einer Lichtemission bei 615 und 665 nm. Wird endogenes IP₁ generiert, so bindet dieses ebenfalls an den EuCryptate markierten Antikörper, so dass der FRET kompensiert wird und das Emissionssignal abnimmt. Somit ist das spezifische Signal invers proportional zur Konzentration von endogenem IP₁, das mit Hilfe einer Standardkurve quantifiziert werden kann.

Die IP₁ Bildung wurde in STC-1 Zellen und in der Kontrollzelllinie 1321N1/hGPR40, welche GPR40 stabil exprimiert, nach Stimulierung mit unterschiedlichen Substanzen gemessen.

STC-1 Zellen und 1321N1/hGPR40 Zellen wurden in 384-well Platten (20.000 Zellen/well) ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen wurden zunächst mit den Stimulantien in Stimulationspuffer bzw. nur mit Stimulationspuffer 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um die Signaltransduktionskaskade anzuregen. Anschließend wurden die Standards und die Kontrolle sowie das IP₁-d2 Konjugat und das Anti-IP₁ Cryptat, gelöst in Lysispuffer, zu den Zellen gegeben und 1 h bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde die Fluoreszenz des Lysats, angeregt bei 337 nm, bei 615 nm und 665 nm mit Hilfe des Victor² Multilabel Readers gemessen.

2.8.2 Messung von intrazellulärem Kalzium mit dem FLIPR^{TETRA} (Fluorometric imaging plate reader)

In der in 2.8.1 beschriebenen Signaltransduktionskaskade kommt es nach Bindung von IP₃ an das endoplasmatische Retikulum zu einem Öffnen von Kalziumkanälen und einem Kalziumeinstrom in den Intrazellularraum, was eine kurzzeitige Membrandepolarisation zur Folge hat. Diese Membrandepolarisation und damit die intrazelluläre Kalziumkonzentrationsänderung kann mittels eines Fluoreszenz-basierten Assays im FLIPR^{TETRA} gemessen werden.

Bei der Methode werden die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen, dessen Emission durch die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration verändert wird. Dieser Vorgang kann in einer durchsichtigen 384-well Platte gemessen werden, für jedes Well eine Zeitkurve aufgezeichnet und gleichzeitig Teststimulantien zugegeben werden.

1321N1/hGPR40 und 1321N1/hGPR120 Zellen wurden in 384-well Platten (schwarz, lysinbeschichtet mit durchsichtigem Boden) ausgesät (15.000 Zellen/well) und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und 50 µl Fluoreszenzfarbstofflösung (Membrane Potential Assay RED, Molecular Devices) zugegeben und 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In einer Substanzplatte wurden die unterschiedlichen Teststimulantien vorgelegt.

Vor dem Start der Messung wurden am FLIPR nach einem Signaltest drei unterschiedliche Parameter, Camera Gain (Signalverstärkung), Exposure Time (Belichtungszeit der Zellen in sec/ Messung), und Excitation Intensity (Belichtungsintensität), so eingestellt, dass die gemessene durchschnittliche Countzahl im Test bei 800-1200 Counts lag.

Nach dem Starten der Messung wurden zunächst 18 Messpunkte in 1-Sekundenintervallen aufgezeichnet, danach wurde mit Hilfe eines 384-well Pipettierkopfes 20 µl der Testlösungen zugegeben und 152 Messpunkte in 1-Sekundenintervallen aufgezeichnet.

2.8.3 ERK1/2-Phosphorylierung in STC-1 Zellen

In STC-1 Zellen wurde die Phosphorylierung der Signalmoleküle ERK1/2 gemessen (P-ERK1/2). Zur Detektion von phosphoryliertem ERK1/2 wurde ein Alpha Screen Assay der Firma Perkin Elmer verwendet (Alpha Screen SureFire Assay). Dabei wird die Detektion von phosphoryliertem ERK1/2 durch eine Immuno-Sandwich-Bindung in Zelllysaten ermöglicht. Der Primärantikörper bindet zunächst an eine

unphosphorylierte Bindungsstelle des ERK1/2 und ein Sekundärantikörper bindet spezifisch an den Phosphatrest des phosphorylierten ERK1/2. Dieser Komplex aus phosphoryliertem ERK1/2 und den beiden Antikörpern wird über ein Bead-basierendes Alpha Screen System detektiert. Dabei bindet der Primärantikörper an Streptavidin markierte Donor Beads und der Sekundärantikörper bindet an Protein A konjugierte Acceptor Beads. Findet eine Komplexbildung statt, so entsteht durch Anregung der Donor Beads bei 680 nm ein FRET und die Acceptor Beads emittieren Licht bei 520-620 nm, was mit Hilfe eines entsprechenden Detektionssystems (Fusion- α) gemessen werden kann.

STC-1 Zellen wurden in einer 384-well Platte in RPMI 1640 ausgesät (20000 Zellen/well) und 16-18 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, wobei die Zellpassage zwischen 3 und 20 lag. Am Folgetag wurde das Medium abgesaugt und 20 μ l Substanzverdünnung zupipettiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und 5 μ l Lysis/Activation Puffer zugegeben und 5-10 min geschüttelt. Die folgenden Schritte wurden bei verringerter Beleuchtung durchgeführt, da die Beads sehr lichtempfindlich sind. Es wurden die Acceptor und die Donor Beads in Reaktionspuffer zusammen pipettiert und pro well 6 μ l dieses Gemisches zugegeben. Die Platte wurde anschließend 1-2 min geschüttelt und anschließend 2 h bei RT im Dunkeln inkubiert, bevor die Platte im Fusion- α gemessen wurde.

2.9 Proliferationsassay: [¹⁴C]-Thymidineinbau in STC-1 Zellen

Die Proliferation wurde in STC-1 Zellen mit Hilfe des Einbaus von radioaktiv markiertem Thymidin untersucht. Dazu wurden die Zellen (15000 Zellen/ well) in Cytostar-T™ 96-well scintillating microplates in RPMI 1640, versetzt mit 5% FKS, ausgesät und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurde das Medium durch FKS-freies Medium (0,5 % BSA) ersetzt und die Zellen weitere 2 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 μ l [¹⁴C]-Thymidin (1,85 MBq/ml) pro well für 22 h mit Fettsäuren (α -Linolensäure und Docosahexaensäure) und Substanzen (C40a und C119) unterschiedlicher Konzentrationen in serumfreiem Medium (0,5 % BSA) inkubiert. Der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin wurde mit dem TopCount NXT gemessen.

2.10 Immunfluoreszenzmikroskopie

2.10.1 Prinzip der Immunfluoreszenzmikroskopie

Mittels spezifisch Fluorophor-gekoppelter Antikörper ist es möglich, bestimmte Antigene nachzuweisen (Immunfluoreszenzmarkierung). Unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops können diese markierten Antigene sichtbar gemacht werden, indem der Fluoreszenzfarbstoff bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird und das emittierte Licht durch Filter dieser Wellenlänge ins Okular tritt. In dieser Arbeit wurde mit der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung gearbeitet, d.h. der Primärantikörper, welcher epitopspezifisch ist, ist an kein Fluorophor gebunden, sondern erst der Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist.

2.10.2 Immunfluoreszenzmarkierung in 1321N1/hGPR120 Zellen

In den 1321N1 Zellen, die mit hGPR120 transfiziert wurden, wurde mittels Immunocytochemie die Proteinexpression des Gens untersucht. Die Zellen wurden in Culture Slides ausgesät (150.000 Zellen/ Kammer) und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 2x mit eiskaltem PBS auf Eis gewaschen und mit eiskaltem Methanol bei -20°C fixiert. Daraufhin erfolgte eine einstündige Blockierung der Zellen mit PBS, versetzt mit 5% Ziegen Serum. Anschließend wurden die Zellen mit dem hGPR120 Primärantikörper, welcher in PBS + 5% Ziegen Serum verdünnt wurde, 1 h bei RT inkubiert (~ 150 µl/ Kammer). Nachdem die Zellen mit PBS 3 x gewaschen wurden, wurden sie mit dem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper ebenfalls 1 h bei RT inkubiert (~ 150 µl/ Kammer). Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen schließlich mit Mounting Medium, welches DAPI enthielt (wässrig, UltraCruz™ Mounting Medium, für Fluoreszenz mit DAPI), eingedeckelt. DAPI (4'-6-Diamidino-2 phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA. Es lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA an. Bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert die DNA im sichtbaren Bereich mit blauer Farbe (Emmission: 461 nm). Anschließend erfolgte eine fluorometrische Analyse mit einem Zeiss-Axioplanmikroskop.

2.10.3 Immunfluoreszenzmarkierung in Rattendarm und – pankreas bzw. Maudarm und -pankreas

Zur Isolierung der unterschiedlichen Gewebe wurden die Tiere zunächst mit 50% Narkoren[®] (vgl. 2.6.1) narkotisiert. Anschließend wurde das Fell mit 70% EtOH getränkt, die äußere Hautschicht (Fell) abgetragen und die Bauchhöhle aseptisch geöffnet. Das Tier wurde über den linken Ventrikel zunächst mit PBS (Phosphate-buffered-saline, pH 7,4) und anschließend mit 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Um den Blutkreislauf zu öffnen, wurde parallel zur Kanülierung des linken Ventrikels der rechte Vorhof geöffnet. Danach konnten die unterschiedlichen Gewebe entnommen werden. Der Pankreas wurde zur Fixierung in Formalin gegeben (4% Formaldehydlösung in Wasser), Ileum und Kolon wurden zunächst mit Hilfe einer Schlundsonde vorsichtig mit PBS von Kotresten gereinigt und anschließend ebenfalls in Formalin fixiert. Nach 2-3 Tagen im Fixativ wurden die Gewebe in einer Entwässerungsvorrichtung (Sakura Tissue Tek[®] VIPTM) entwässert (aufsteigende Alkoholreihe: 30 min in 4% Formalin, 1 h in 50% Isopropanol, 1h in 70% Isopropanol, 1 h in 80% Isopropanol, 1 h in 96% Isopropanol, 2x 1 h in 100% Isopropanol, 2x1 h in 100% Xylol, 4x 1h in Paraffin (60°C)) und in Paraffin eingebettet. Nach Erkalten der Paraffinblöcke wurden an einem Schlittenmikrotom 2 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf SuperFrost Plus Objektträger aufgezogen. Diese wurden über Nacht bei RT getrocknet.

Am Folgetag wurden diese Gewebeschnitte zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert: 3x 5 min in Xylol, 2x 2 min in 100% EtOH, 2x 2 min in 96% EtOH, 2x 2 min in 70% EtOH und 2x kurz in ddH₂O. Anschließend wurde eine Demaskierung der Gewebeschnitte durchgeführt. Unter Demaskierung versteht man das Lösen von sog. cross-links, die während des Fixierungsprozesses zwischen dem Formalin und den Proteinen entstanden sind. Dadurch werden die Antigene in den Geweben verdeckt, so dass eine Immundetektion nicht möglich wäre. Durch die Behandlung mit einem Demaskierungsreagenz können diese cross-links gelöst werden, so dass die Antigene und Epitope für die Antikörper frei zugänglich sind. Als Demaskierungspuffer wurde der BD Pharmingen Retrieval A (pH 6,0) Puffer eingesetzt. Die Schnitte wurden 30 min im Dampfgerar behandelt (95- 100°C).

Anschließend wurden die Schnitte 20 min bei RT in einem kalten Wasserbad abgekühlt und danach 15 min einer Triton-Behandlung unterzogen (0,3% Triton in einer Goat Serum Phosphat-gepufferten Salzlösung (GSDB)), was der Permeabilisierung des Gewebes dient. Daraufhin folgte eine 45-minütige Blockierung mit GSDB-Saponin (0,1% Saponin) in der feuchten Kammer.

Anschließend wurden die Schnitte mit den entsprechenden Primärantikörpern, welche in GSDB-Saponin verdünnt wurden, 1 h bei RT in der feuchten Kammer inkubiert (~150 µl/ Schnitt). Bei Doppelmarkierung eines Schnittes mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern wurden beide gleichzeitig in GSDB-Saponin auf den Schnitt gegeben. Die Schnitte wurden 3x 5 min mit PBS gewaschen und dann mit den unterschiedlichen fluorophorkonjugierten Sekundärantikörpern gleichzeitig ebenfalls 1 h bei RT inkubiert (~150 µl/ Schnitt). Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte schließlich mit Mounting Medium, welches DAPI enthielt (wässrig, UltraCruz™ Mounting Medium, für Fluoreszenz mit DAPI), eingedeckelt. Anschließend erfolgte eine fluorometrische Analyse mit einem Zeiss-Axioplanmikroskop (Zeiss).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Expression verschiedener GPCR-Gene in L-Zellmodellen und im Rattendarm

Zunächst wurde eine Expressionsanalyse unterschiedlicher G-Protein gekoppelter Rezeptoren in den L-Zelllinien STC-1 und NCI-H716 durchgeführt. Dazu wurde eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Die Analyse zeigte, dass die drei Rezeptoren GPR40, GPR119 und GPR120 in den murinen STC-1 Zellen exprimiert werden und dass GPR40 sowie GPR120, nicht aber GPR119 in den humanen NCI-H716 Zellen exprimiert werden (Tab. 3-1).

	GPR40	GPR119	GPR120
STC-1	0,9	0,8	1,2
NCI-H716	0,5	n.d.	0,9

Tab. 3-1 Real-Time PCR zum Nachweis von GPR40, GPR119 und GPR120 in unterschiedlichen Zelllinien. Die Expression der Gene in den Zelllinien wurde in Relation zu GAPDH gesetzt.

Zur Expressionsanalyse G-Protein gekoppelter Rezeptoren im Rattenkolon und Rattenileum wurden Proben aus nüchternen Ratten entnommen. Die Analyse zeigte, dass auch in Rattenileum und –kolon die drei Rezeptoren GPR40, GPR119 und GPR120 exprimiert werden. In Tabelle 3-2 ist die Expression der drei Gene in Bezug auf GAPDH dargestellt. GPR40 wird im Ileum höher exprimiert als im Kolon. GPR119 wird im Ileum und im Kolon ungefähr gleich hoch exprimiert. GPR120 wird im Kolon um den Faktor 4 höher exprimiert als im Ileum (Tabelle 3-2).

	GPR40	GPR119	GPR120
Ileum	4,6	4,5	21,2
Colon	3,0	4,1	81,1

Tab. 3-2: Real-Time PCR zum Nachweis von GPR40, GPR119 und GPR120 in Rattenileum und –kolon. Die Expression in den Geweben wurde in Relation zu GAPDH gesetzt.

Somit zeigt die Expressionsanalyse verschiedener G-Protein gekoppelter Rezeptoren, dass die drei GPCRs GPR40, GPR119 und GPR120 sowohl in vitro in enteroendokrinen Zellen, als auch in Rattenileum und –kolon exprimiert werden. Aufgrund dieser Expressionsanalyse und aufgrund der Tatsache, dass GPR40 und GPR119 in den pankreatischen β -Zellen die glukoseinduzierte Insulinsekretion verstärken [53, 62] und GPR120 die GLP-1 Sekretion aus L-Zellen in vitro stimuliert

(Hirasawas et al. 2005), wurde in der vorliegenden Arbeit die Lokalisation, Funktion und Signaltransduktion dieser drei Rezeptoren in L-Zellen und β -Zellen in vitro und ex vivo untersucht.

3.2 Untersuchung der Proteinexpression unterschiedlicher GPCRs im Rattenileum und Rattenkolon

Nachdem die Expression von GPR40, GPR119 und GPR120 auf mRNA-Ebene in Rattenileum und -kolon nachgewiesen werden konnte, wurde die Rezeptorexpression auf Proteinebene verifiziert. Dazu wurden Western Blot Analysen mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Auch auf Proteinebene konnte die Expression von GPR40 (31,9 kDa), GPR119 (34 kDa) und GPR120 (41 kDa) sowohl in Rattenileum als auch im -kolon nachgewiesen werden (Abb. 3-1 A-C). Die Kolonproben wurden vom Zäkum in Richtung Rektum von 1-4 bzw. 1-5 durchnummeriert, die Ileumproben wurden vom Jejunum in Richtung Zäkum von 1-4 bzw. 1-5 durchnummeriert.

Die Proteinexpression von GPR40 ist im Kolon höher als im Ileum. Im Ileum sind nur schwache GPR40 Banden sichtbar, was auf eine geringe Rezeptorexpression hinweist. Im Kolon sind dagegen deutliche Banden zu erkennen. Somit unterscheidet sich das Expressionsmuster von GPR40 zwischen mRNA- und Proteinebene, denn die mRNA-Expression des Rezeptors ist im Ileum höher als im Kolon.

GPR119 ist auf Proteinebene im Kolon höher exprimiert als im Ileum. Auf mRNA-Ebene ist die Expression von GPR119 in beiden Geweben ähnlich hoch.

Die Western Blot Analyse bezüglich GPR120 zeigt, dass der Rezeptor in Kolon und Ileum auch auf Proteinebene exprimiert wird. Im Gegensatz zur Expression von GPR120 auf mRNA-Ebene ist die Proteinexpression im Kolon und Ileum ähnlich hoch.

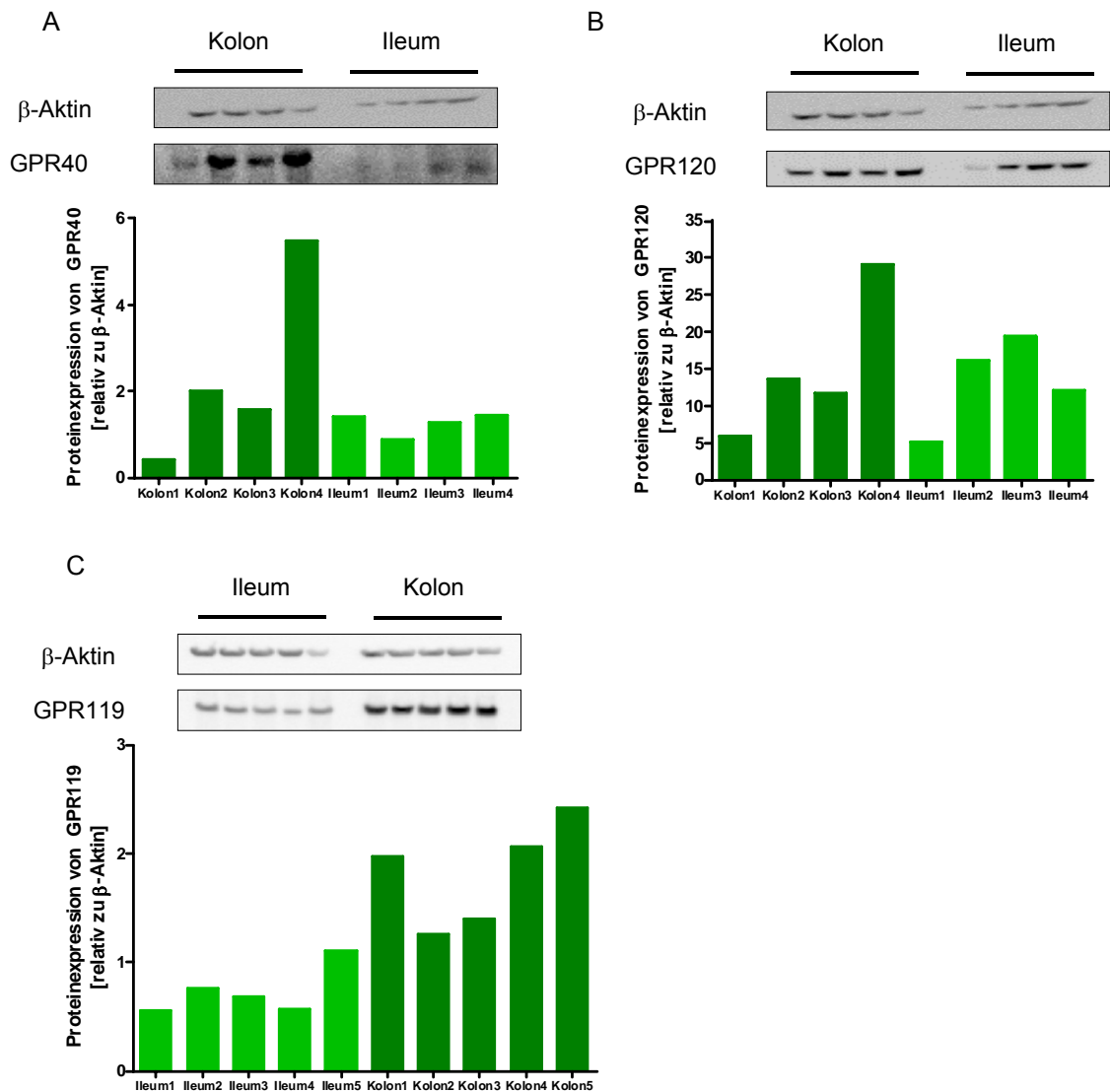


Abb. 3-1 A-C: Proteinexpression von GPR120, GPR40 und GPR119 in Rattenkolon und -ileum. Western Blot Analyse mit den humanen GPR40 und GPR120 Antikörpern sowie dem Maus GPR119 Antikörper. Der Abgleich der Antikörper erfolgte nach einem Stripping-Schritt der Membran mit einem β -Aktin-Antikörper (43 kDa).

Die Expression aller drei Rezeptoren im Rattenileum und -kolon führte zu der Frage, wo GPR40, GPR119 und GPR120 im Rattendarm lokalisiert sind und welche Aufgabe die Rezeptoren in den Geweben übernehmen. Diesen Fragen wurde in den folgenden Versuchen in vitro und ex vivo nachgegangen.

3.3 Untersuchung der Lokalisation von GPR40, GPR119 und GPR120 in Ratten- und Maudarm mittels Immunfluoreszenz

Nachdem auf RNA- und auf Proteinebene die Expression von GPR40, GPR119 und GPR120 bestätigt wurde, wurde die zelluläre Lokalisation der drei Rezeptoren im Ratten- und Maudarm untersucht. Ausgehend von der Hypothese, dass die Rezeptorproteine bei der GLP-1 Sekretion aus L-Zellen nach Stimulierung mit unterschiedlichen Liganden eine Rolle spielen, wurde die Colokalisation von GLP-1 und GPR40, GPR119 und GPR120 in Paraffinschnitten aus Rattenkolon und -ileum mit Hilfe der Immunfluoreszenzmarkierung untersucht. Die Gewebeschnitte wurden zu diesem Zweck mit einem GLP-1 spezifischen Antikörper und einem GPCR-spezifischen Antikörper inkubiert und anschließend mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Sekundärantikörpern behandelt. Als Sekundärantikörper gegen den GLP-1 Antikörper wurde ein Alexa 488 markierter Antikörper verwendet, für die GPCRs wurde ein Cy3 markierter Sekundärantikörper eingesetzt. Somit wird die GLP-1 Färbung in grün dargestellt, die GPCR-Färbung ist dagegen in rot gezeigt. Eine Übereinanderlagerung beider Färbungen erscheint gelb. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau fluoreszierend) angefärbt.

In Abbildung 3-2 ist die Colokalisation von GPR40 und GLP-1 im Rattenkolon dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass GLP-1 und GPR40 im Kolon colokalisiert sind. Darüber hinaus wird deutlich, dass sich die L-Zellen im Darmepithel zwischen den Enterozyten befinden. Entsprechend wurde auch die Colokalisation von GPR119 und GPR120 mit GLP-1 in Rattenkolon untersucht. Auch hierbei konnte gezeigt werden, dass die beiden Rezeptoren und GLP-1 colokalisiert sind (Abb. 3-3 A und B).

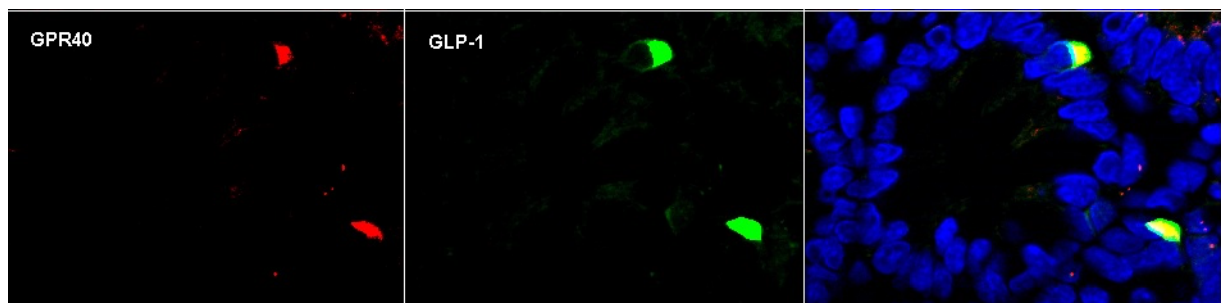


Abb. 3-2: Detektion von GPR40 in den L-Zellen im Rattenkolon. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen eine Colokalisation von GPR40 (links, roter Kanal) mit GLP-1 (Mitte, grüner Kanal). Der Zellkern ist mit DAPI angefärbt (rechts, blauer Kanal). Die Übereinanderlagerung der GPR40 und GLP-1 Färbung ist in gelb dargestellt (rechts).

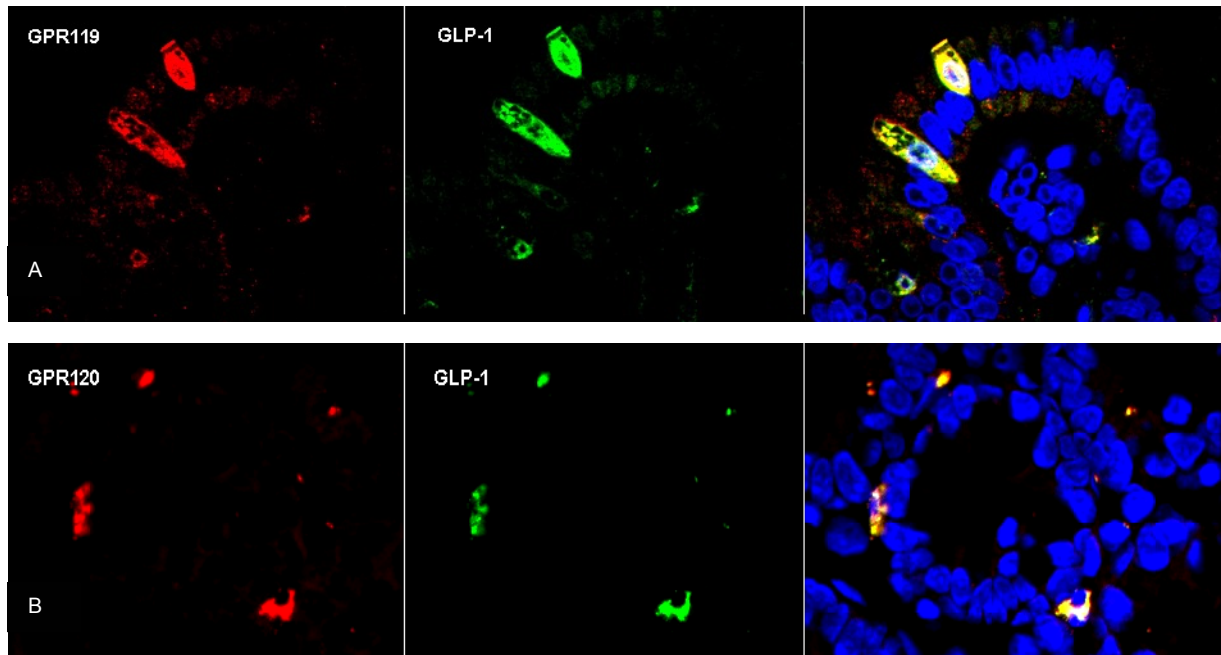


Abb. 3-3: Detektion von GPR119 (A) und GPR120 (B) in den L- Zellen im Rattenkolon. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen eine Colokalisation von GPR119 bzw. GPR120 (links, roter Kanal) mit GLP-1 (Mitte, grüner Kanal). Der Zellkern ist mit DAPI angefärbt (rechts, blauer Kanal). Die Übereinanderlagerung der GPCRs und GLP-1 Färbung ist in gelb dargestellt (rechts).

Dieselben Versuche wurden mit Mauskolonparaffinschnitten durchgeführt. Eine Färbung der Schnitte mit GPR40 (Abb. 3-4 A) bzw. GPR120 (Abb. 3-4 B) mit GLP-1 zeigt, dass die GPCRs in den L-Zellen im Mausdarm exprimiert werden.

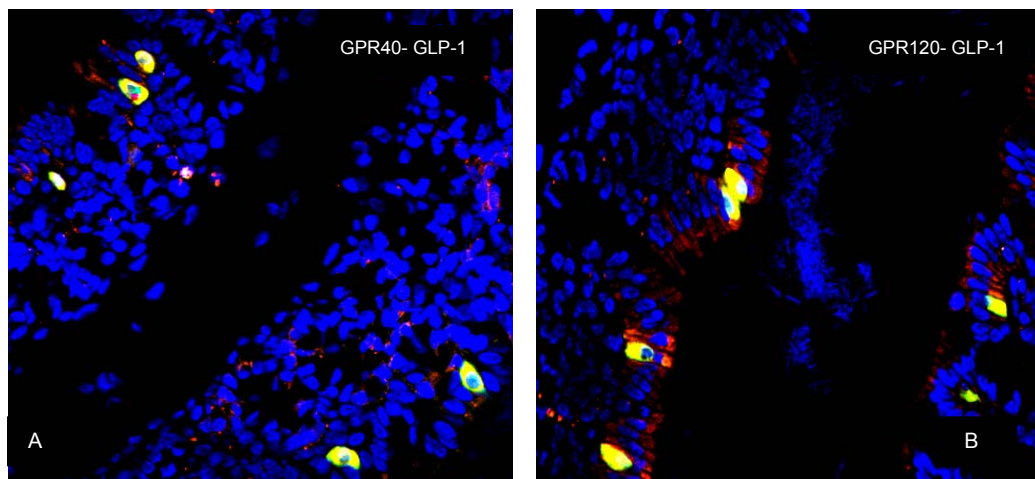


Abb. 3-4: Detektion von GPR40 (A) und GPR120 (B) in den L- Zellen im Mauskolon. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen eine Colokalisation von GPR40 bzw. GPR120 (roter Kanal) mit GLP-1 (grüner Kanal). Der Zellkern ist mit DAPI angefärbt (blauer Kanal). Die Übereinanderlagerung der GPCRs und GLP-1 Färbung ist in gelb dargestellt.

Da L-Zellen hauptsächlich im Kolon und Ileum lokalisiert sind, wurde neben dem Rattenkolon auch im Rattenileum untersucht, ob GPR40, GPR119 und GPR120 und GLP-1 colokalisiert sind. Alle drei Rezeptoren sind auch im Rattenileum in den L- Zellen lokalisiert. Jedoch wurde im Vergleich zum Rattenkolon, im -ileum eine

Fluoreszenzfärbung der GPCRs und GLP-1 im Inneren der Darmzotten beobachtet (Abb. 3-5).

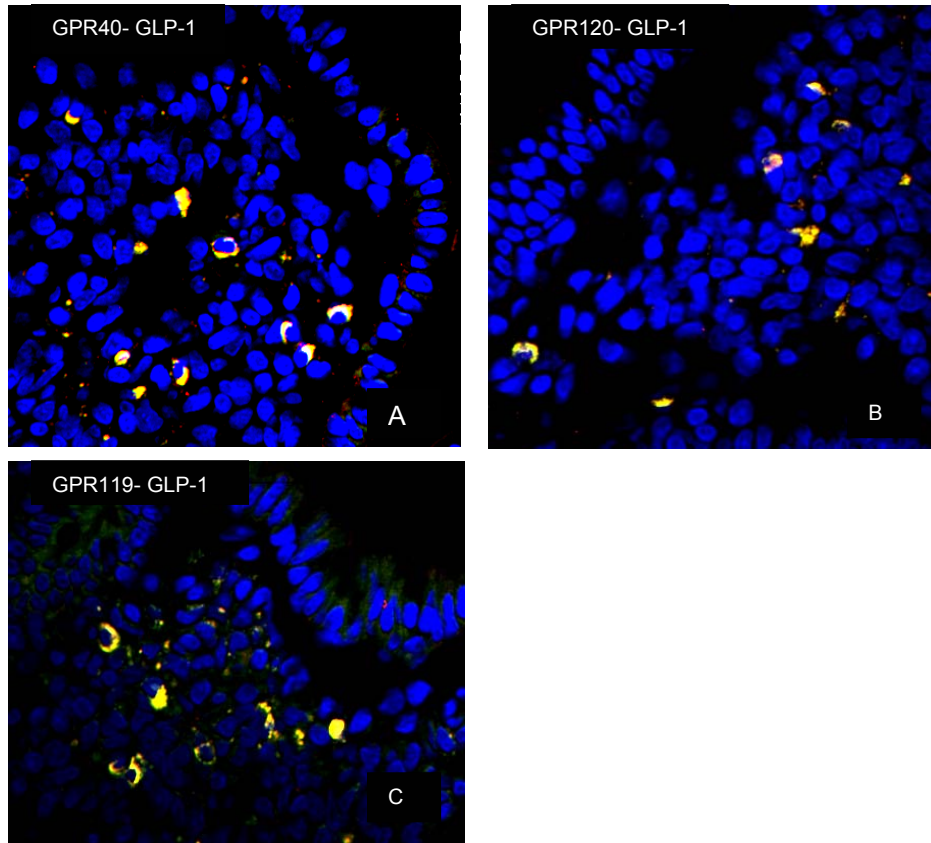


Abb. 3-5: Detektion von GPR40 (A), GPR120 (B) und GPR119 (C) in den L- Zellen im Rattenileum. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen eine Colokalisation von GPR40, GPR119 bzw. GPR120 (roter Kanal) mit GLP-1 (grüner Kanal). Der Zellkern ist mit DAPI angefärbt (blauer Kanal). Die Übereinanderlagerung der GPCRs und GLP-1 Färbung ist in gelb dargestellt.

Folglich wurde gezeigt, dass GPR40, GPR119 und GPR120 in den L-Zellen im Rattenileum und -kolon exprimiert werden und dass die Rezeptoren sowohl im Ratten- als auch im Maudarm mit GLP-1 colokalisiert sind. Daher wurde in nachfolgenden Versuchen überprüft, welche funktionelle Bedeutung diese Rezeptoren und deren Signaltransduktionen in L-Zellen haben.

3.4 Charakterisierung von GPR40 und GPR120 in überexprimierenden Zellsystemen und in STC-1 Zellen

Nachdem die Expressions- und die Lokalisationsstudien der drei G-Protein gekoppelten Rezeptoren GPR40, GPR119 und GPR120 gezeigt haben, dass die drei Rezeptoren in den L-Zellen lokalisiert sind, wurde in folgenden Experimenten die Signaltransduktion von GPR40 und GPR120 detailliert untersucht. GPR40 und GPR120 sind Fettsäurerezeptoren für langkettige ungesättigte Fettsäuren [53, 55, 58].

Literaturangaben zufolge sind GPR40 und GPR120 $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptoren [53, 54, 58]. Daher wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit die Kopplung von GPR40 und GPR120 an G-Proteine der $G_{\alpha q}$ -Familie in der enteroendokrinen STC-1 Zelllinie und in 1321N1 Zellen, die GPR40 und GPR120 stabil exprimieren, untersucht. Bei den 1321N1 Zellen handelt es sich um humane Astrozytenzellen. Das humane GPR40 Genkonstrukt wurde von der Firma Euroscreen kloniert und in die Astrozytenzelllinie transfiziert (1321N1/hGPR40), dagegen wurde das humane GPR120 Genkonstrukt im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert.

3.4.1 Klonierung von pcDNA3.1/ 5V-His_hGPR120

Zur näheren Charakterisierung von GPR120 wurde mittels der TOPO-TA Technologie die cDNA für hGPR120, gewonnen aus der humanen Zelllinie NCI-H716 und aus humaner Dünndarm mRNA, in den TOPO-Vektor pcDNA3.1/5V-His kloniert. Anschließend wurden TOP 10 kompetente Zellen mit dem klonierten Konstrukt transformiert. Nach der DNA-Präparation der Einzelklone wurde mit dem Primerpaar T7/ BGH eine PCR durchgeführt, um zu überprüfen, ob die hGPR120-DNA in den Expressionsklonen enthalten war. Schließlich wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym Bgl II mit den Klonen, die das Plasmid eingebaut hatten, ein Testverdau durchgeführt. Dieses Enzym schneidet das Plasmid (Gesamtgröße: 6661 bp) in zwei Stücke mit Basengrößen von 1555 bp und 5106 bp. Mit ausgewählten Klonen (Klone 4, 5 und 7 aus den NCI-H716 Zellen, Klone 4 und 9 aus der humanen Dünndarm RNA), in die das Plasmid korrekt eingebaut wurde, wurde eine Maxipräparation durchgeführt. Die anschließende Sequenzierung der fünf Plasmide zeigte, dass das isolierte hGPR120 Konstrukt 48 bp kleiner war als das veröffentlichte Konstrukt mit der Accession No.: NM_181745- Exon 3 fehlte bei allen fünf Klonen. Allerdings gibt es für hGPR120 eine weitere veröffentlichte

Splicevariante (BC101175), bei welcher genau dieses Exon 3 fehlt. Die hier isolierte Splicevariante zeigte eine 100 %-ige Homologie zu dieser kurzen Splicevariante. Da diese kurze Splicevariante u.a. aus humaner Dünndarm RNA isoliert wurde, wurde der Schluss gezogen, dass offensichtlich diese kurze Splicevariante und nicht die lange Splicevariante im menschlichen Darm exprimiert wird. Das Labor von Herrn Dr. Mennerich von Boehringer-Ingelheim führte freundlicherweise eine Untersuchung hinsichtlich der Expression der Splicevarianten in humanen Geweben durch. Es zeigte sich, dass nur die kurze Splicevarianten (BC101175) in humanem Gewebe exprimiert wird (Abb. 3-6).

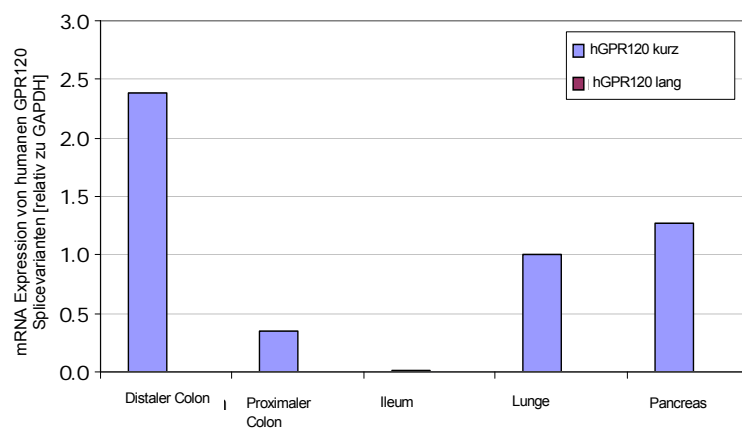


Abb. 3-6: Expression von GPR120 in verschiedenen humanen Geweben. In blau dargestellt ist die Expression der kurzen GPR120 Splicevariante (BC101175), in violett dargestellt ist die Expression der langen Splicevariante (NM_181745). In Kolon, Lungengewebe und Pankreas wird nur die kurze, nicht aber die lange Splicevariante von GPR120 exprimiert.

3.4.2 Nachweis der GPR120 Proteinexpression in 1321N1/hGPR120 Zellen

Mittels Immunfluoreszenz wurde anschließend die Proteinexpression von GPR120 in 1321N1/hGPR120 Zellen nachgewiesen. Parallel dazu wurden auch 1321N1 Zellen mit dem GPR120 Antikörper inkubiert, die GPR120 Proteinexpression war in den nichttransfizierten Zellen nicht nachweisbar (Abb. 3-7 A und B).

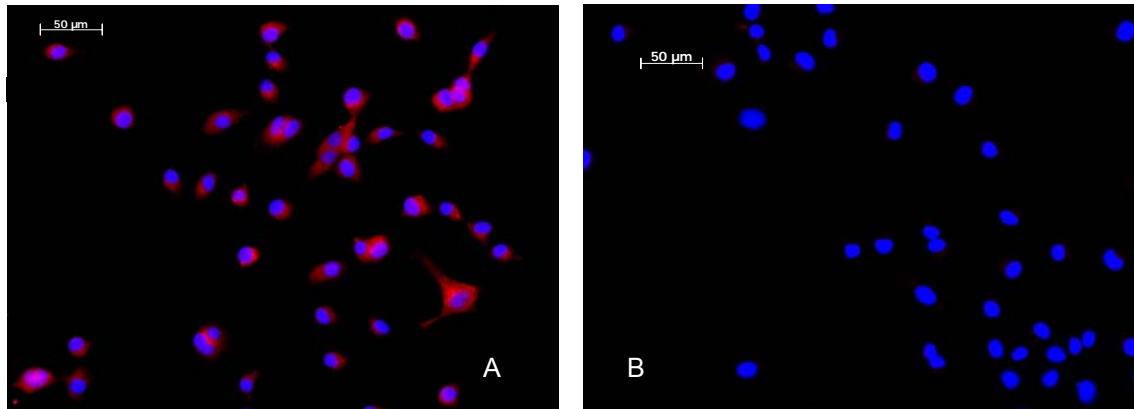


Abb. 3-7: GPR120 Proteinexpressionsnachweis in 1321N1/hGPR120 Zellen (A) verglichen mit nichttransfizierten Zellen (B). Die Zellen wurden mit einem Kaninchen anti-humanen GPR120 Antikörper inkubiert und anschließend mit einem Cy3 (rot) konjugierten Sekundärantikörper behandelt. Eine Gegenfärbung des Zellkerns wurde mit DAPI (blau) durchgeführt.

3.4.3 Einfluss von langkettigen Fettsäuren und GPR40 Agonisten auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration

Die Aktivierung $G_{\alpha q}$ -gekoppelter Proteine führt über die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4, 5-phosphat zur Bildung von IP_3 und DAG (Diacylglycerol). IP_3 bindet daraufhin an das Endoplasmatische Reticulum und stimuliert den Ausstrom von Kalzium in den Intrazellularraum. Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration stimuliert in der L-Zelle die Exozytose von GLP-1 Granula (vgl. 1.2.3).

In folgenden Experimenten wurde die Signaltransduktion der beiden $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptoren GPR40 und GPR120 untersucht. Dazu wurde die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach der Stimulierung der 1321N1/hGPR40 Zellen und der 1321N1/hGPR120 Zellen mit Fettsäuren und GPR40 Agonisten mit Hilfe des FLIPR Kalzium Assays gemessen.

Zunächst wurde die Wirkung der Fettsäuren und der GPR40 Agonisten im 1321N1/hGPR40 Zellen untersucht. Die Zellen wurden im FLIPR mit α -Linolensäure, Ölsäure und Docosahexaensäure sowie den GPR40 Agonisten C40a,

C40b und C40c stimuliert und die Fluoreszenzänderung, repräsentativ für die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, vor, während und nach Substanzzugabe gemessen. Die maximale Fluoreszenzänderung wurde als Maß für die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration herangezogen. Die Stimulation der 1321N1/hGPR40 Zellen mit α -Linolensäure, Ölsäure und Docosahexaensäure führte zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung des Fluoreszenzsignals und damit zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Abb. 3-8 A und B). Es wurde beobachtet, dass alle drei Fettsäuren ähnlich potent und effizient sind.

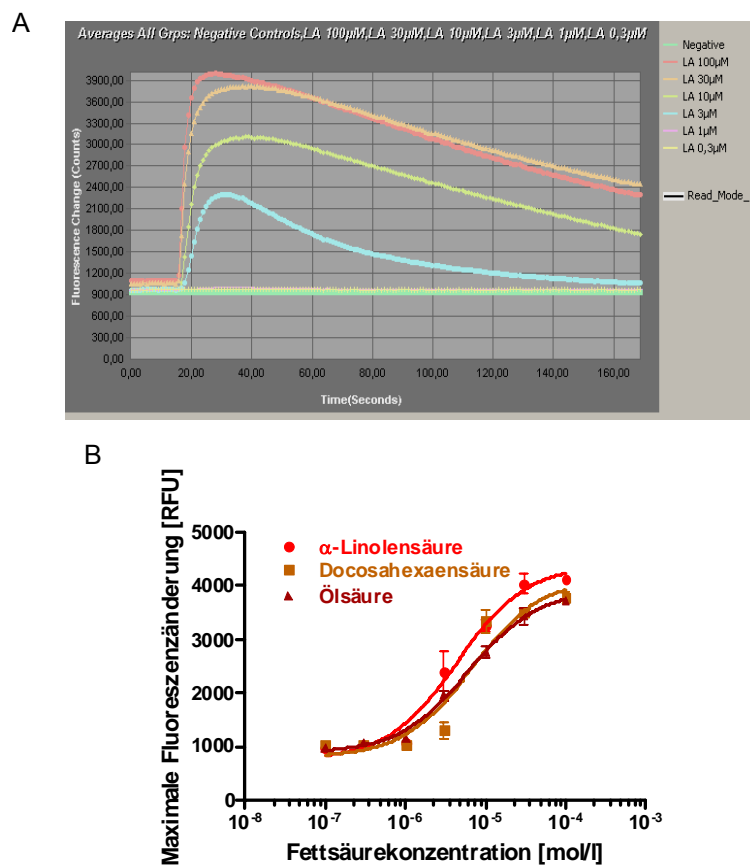


Abb. 3-8 A und B: Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in 1321N1/hGPR40 Zellen nach Stimulation mit α -Linolensäure, Docosahexaensäure und Ölsäure. Werte als Mittelwert \pm SEM. n= 4. (EC_{50} (α -Linolensäure)= 4,4 μ mol/l, EC_{50} (Ölsäure)= 6,1 μ mol/l, EC_{50} (Docosahexaensäure)= 6,8 μ mol/l, repräsentativ für n=3). (RFU= relative fluorescence units)

In den 1321N1/hGPR40 Zellen, stimuliert mit den GPR40 Agonisten C40a, C40b und C40c, konnte ebenfalls konzentrationsabhängig eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration beobachtet werden (Abb. 3-9).

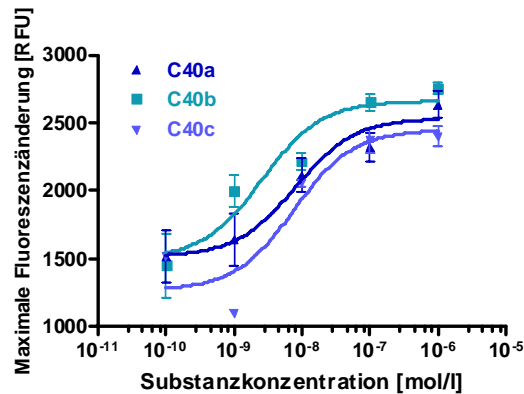
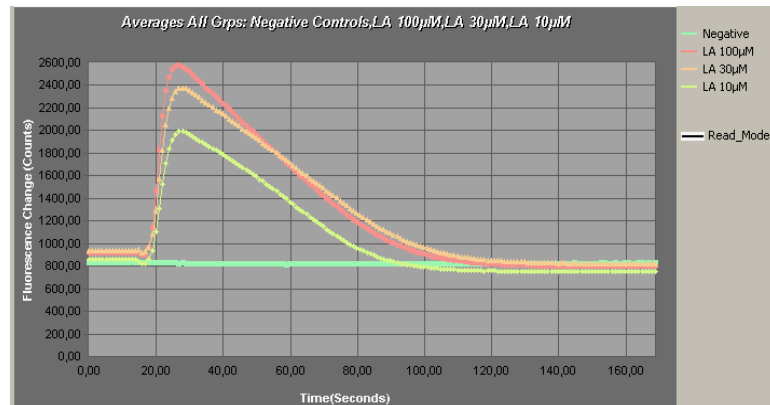


Abb. 3-9: Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in 1321N1/hGPR40 Zellen nach Stimulation mit den GPR40 Agonisten C40a, C40b und C40c. Werte als Mittelwert \pm SEM. $n = 4$. (EC_{50} (C40a) = 8,0 nmol/l, EC_{50} (C40b) = 2,0 nmol/l, EC_{50} (C40c) = 7,6 nmol/l, repräsentativ für $n=3$). (RFU= relative fluorescence units)

Analog zu diesen Untersuchungen wurde in der Zelllinie 1321N1/hGPR120 die Wirkung der Fettsäuren α -Linolensäure, Ölsäure und Docosahexaensäure auf die GPR120 vermittelte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration untersucht. Darüber hinaus konnte mit Hilfe dieser Zelllinie überprüft werden, ob die GPR40 Agonisten C40a, C40b und C40c selektiv an GPR40 oder evtl. auch GPR120 aktivieren. Zunächst wurde von den stabil transfizierten Zellklonen derjenige ausgewählt, bei dem nach Stimulation mit α -Linolensäure im FLIPR die höchste Fluoreszenzänderung gemessen wurde. Anschließend wurde die Wirkung der Fettsäuren α -Linolensäure, Ölsäure und Docosahexaensäure untersucht und es konnte gezeigt werden, dass alle drei Fettsäuren den intrazellulären Kalziumspiegel konzentrationsabhängig erhöhen (Abb. 3-10 A und B). Jedoch wurde beobachtet, dass sich die Effizienz und die Potenz der drei Fettsäuren auf die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration unterscheidet.

A



B

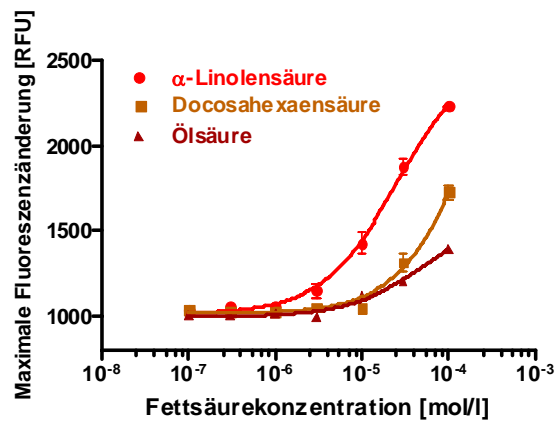


Abb. 3-10 A: Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in 1321N1/hGPR120 Zellen (Klon 33) nach Stimulation mit α -Linolensäure (LA). B: Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in 1321N1/hGPR120 Zellen nach Stimulation mit α -Linolensäure, Ölsäure und Docosahexaensäure. Die Fluoreszenzänderung ist absolut in Fluoreszenz Counts angegeben. Werte als Mittelwert \pm SEM. $n = 4$ (repräsentativ für $n=3$) (* EC_{50} (α -Linolensäure)= 25,9 $\mu\text{mol/l}$, * EC_{50} (Ölsäure)= 52,2 $\mu\text{mol/l}$, * EC_{50} (Docosahexaensäure)= 250 $\mu\text{mol/l}$). (RFU= relative fluorescence units)

* EC_{50} : scheinbare EC_{50} Werte

Die Stimulation der 1321N1/hGPR120 Zellen mit den GPR40 Agonisten C40a, C40b und C40c hatten keinen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration. (Abb. 3-11).

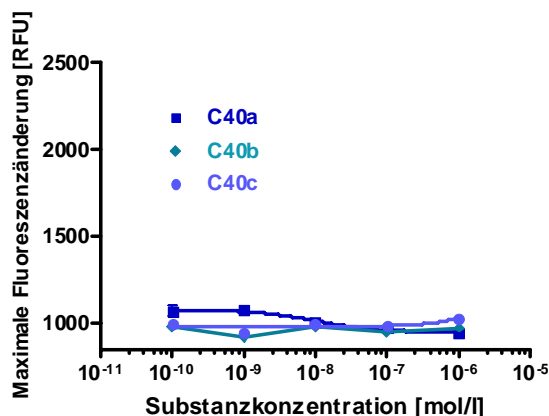


Abb. 3-11: Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in 1321N1/hGPR120 Zellen nach Stimulation den GPR40 Agonisten C40a, C40b und C40c. Werte als Mittelwert \pm SEM. n= 4, repräsentativ für n=3. (RFU= relative fluorescence units)

Somit konnte mit Hilfe dieser GPR40 und GPR120 Modellzelllinien gezeigt werden, dass langkettige ungesättigte Fettsäuren die $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Signaltransduktion über eine Bindung an GPR40 und GPR120 stimulieren. Außerdem wurde gezeigt, dass die GPR40 Agonisten C40a, C40b und C40c selektiv GPR40 aktivieren. Daher wurden diese Agonisten in weiteren Experimenten zur Charakterisierung von GPR40 eingesetzt.

3.4.4 Einfluss von langkettigen Fettsäuren und GPR40 Agonisten auf die intrazelluläre IP₁ Bildung

Innerhalb der $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Signaltransduktionskaskade ist der Mobilisierung intrazellulärer Kalziumspeicher eine Erhöhung der intrazellulären IP₃ (D-*myo*-Inositol 1,4,5-Phosphat) Konzentration vorangeschaltet (vgl. 1.4). Die Bildung von IP₃ führt wie in 3.5.2 erklärt über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zur GLP-1 Sekretion. IP₃ wird im Intrazellulärraum jedoch recht schnell zu IP₂ und IP₁ und schließlich zu *myo*-Inositol abgebaut. LiCl verhindert den Abbau von IP₁.

Die $G_{\alpha q}$ -Kopplung von GPR40 und GPR120 wurde in folgenden Experimenten weiter charakterisiert, indem in STC-1 Zellen und in 1321N1/hGPR40 Zellen die Erhöhung der intrazellulären IP₁ Konzentration nach Stimulation mit selektiven und unselektiven Rezeptoragonisten bestimmt wurde. Mit Hilfe der STC-1 Zellen, die GPR40 und GPR120 endogen exprimieren, sollte in diesen Experimenten der Zusammenhang zwischen der Aktivierung von GPR40 und GPR120 und des dadurch induzierten $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Signaltransduktionsweges erarbeitet werden.

Zunächst wurde die IP₁ Bildung nach Stimulation mit den langkettigen ungesättigten freien Fettsäuren α -Linolensäure und Ölsäure und den GPR40 Agonisten C40a und C40b zur Assayetablierung in der 1321N1/hGPR40 Kontrollzelllinie untersucht. Es wurde gezeigt, dass die beiden Fettsäuren α -Linolensäure und Ölsäure zu einer konzentrationsabhängigen IP₁ Bildung führen (Abb. 3-12 A). Jedoch wurde die IP₁ Bildung durch Ölsäure stärker stimuliert als durch α -Linolensäure. Dagegen wurde in Abb. 3-8 gezeigt, dass die beiden Fettsäuren die intrazellulären Kalziumkonzentration ähnlich stark erhöhen.

Wie zu erwarten, stimulieren auch die beiden GPR40 Agonisten die IP₁ Bildung konzentrationsabhängig (Abb. 3-12 B)

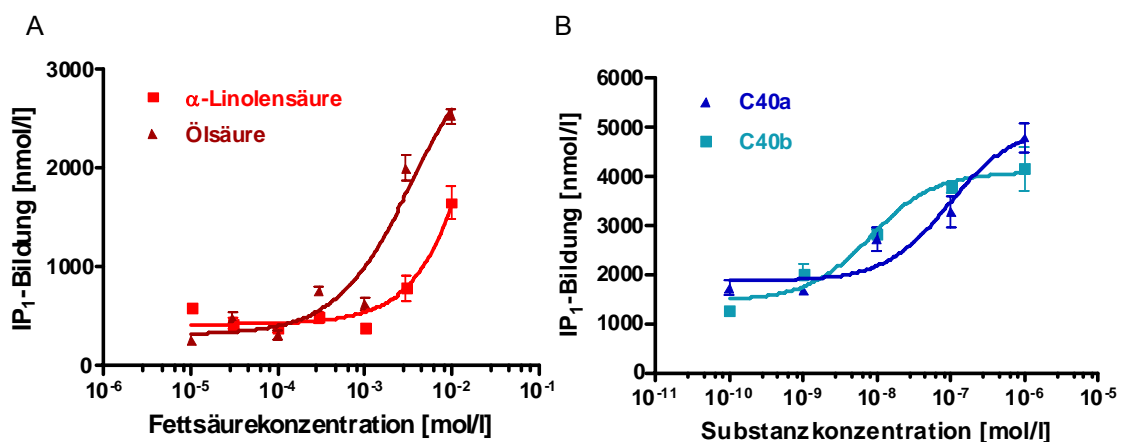


Abb. 3-12: IP₁ Bildung in 1321N1/hGPR40 Zellen nach Stimulierung mit α -Linolensäure, Ölsäure (A) sowie den GPR40 Agonisten C40a und C40b (B). Die Inkubation erfolgte über 1 h in KRBH. Anschließend wurde IP₁ in den lysierten Zellen gemessen. Werte als Mittelwert \pm SEM, n= 4. (EC₅₀ (C40a)= 95,3 nmol/l, EC₅₀ (C40b)= 5,8 nmol/l, *EC₅₀ (α -Linolensäure)= 33,7 μ mol/l, *EC₅₀ (Ölsäure)= 3,5 μ mol/l, repräsentativ für n= 3)

*EC₅₀: scheinbare EC₅₀ Werte

Anschließend wurde die IP₁ Bildung in STC-1 Zellen nach Stimulierung mit α -Linolensäure und Ölsäure sowie den GPR40 Agonisten untersucht. Erwartungsgemäß wurde auch in diesen Untersuchungen eine erhöhte IP₁ Bildung durch die Stimulation mit den Fettsäuren und den selektiven Rezeptoragonisten gemessen (Abb. 3-13 A und 3-13 B), wobei diese im Vergleich zur IP₁ Bildung in 1321N1/hGPR40 Zellen sehr viel geringer ist.

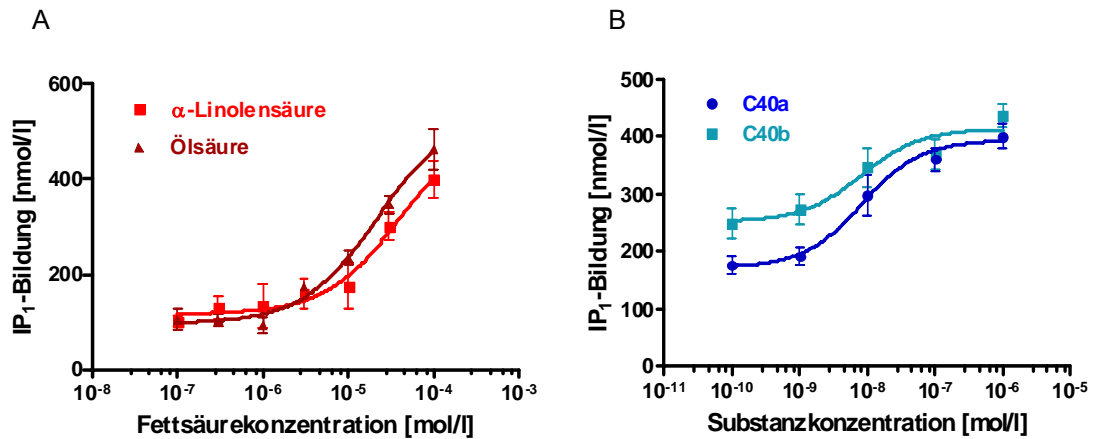


Abb. 3-13: IP₁ Bildung in STC-1 Zellen nach Stimulierung mit α -Linolensäure, Ölsäure (A) sowie den GPR40 Agonisten C40a und C40b (B). Die Inkubation erfolgte über 1 h in KRBH. Anschließend wurde IP₁ in den lysierten Zellen gemessen. Werte als Mittelwert \pm SEM, n= 4. (EC₅₀ (C40b)= 8,8 nmol/l, EC₅₀ (C40a)= 8,2 nmol/l, *EC₅₀ (α -Linolensäure)= 4,0 μ mol/l, *EC₅₀ (Ölsäure)= 2,1, μ mol/l, repräsentativ für n= 3)

*EC₅₀: scheinbare EC₅₀ Werte

Somit wurde gezeigt, dass die Bindung von selektiven und unselektiven GPR40 und GPR120 Agonisten über den G _{α q}-gekoppelte Signalweg die IP₁ Bildung in STC-1 Zellen stimulieren. In den nachfolgenden Experimenten sollte nun die Bedeutung der GPR40- und GPR120-induzierten G _{α q}-gekoppelten Signaltransduktion für die Funktion in L-Zellen untersucht werden.

3.5 GLP-1 Sekretionsstudien an unterschiedlichen in vitro und ex vivo Modellen

3.5.1 GLP-1 Freisetzung aus den STC-1 Zellen

Zunächst wurde die funktionelle Bedeutung von GPR40, GPR119 und GPR120 in vitro unter Verwendung der murinen STC-1 Zelllinie untersucht. Die enteroendokrinen STC-1 Zellen sind in der Lage, GLP-1 zu bilden und auszuschütten. Mit Hilfe der STC-1 Zellen, die zum einen GPR40 und GPR120 endogen exprimieren und zum anderen den $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Signaltransduktionsweg aktivieren, wurde in diesen Experimenten der Zusammenhang zwischen der Aktivierung der beiden Rezeptoren und der Bedeutung des nachgeschalteten Signaltransduktionsweges für die GLP-1 Sekretion erarbeitet.

Da GPR40 und GPR120 Rezeptoren für langkettige ungesättigte Fettsäuren sind [53, 55, 58], wurde in STC-1 Zellen die GLP-1 Sekretion nach Stimulation mit unterschiedlichen langkettigen Fettsäuren (α -Linolensäure, Docosahexaensäure, Ölsäure und Palmitinsäure) und mit dem GPR40 Agonisten C40a [116] gemessen, um die Funktion von GPR40 und GPR120 bei der GLP-1 Sekretion in vitro zu untersuchen. Unter Verwendung des spezifischen GPR40 Agonisten C40a wurde überprüft, ob GPR40 oder GPR120 bei der fettsäureinduzierten GLP-1 Ausschüttung eine Rolle spielen.

Die Stimulierung der STC-1 Zellen mit den ungesättigten Fettsäuren Ölsäure, α -Linolensäure und Docosahexaensäure führte zu einer konzentrationsabhängigen GLP-1 Sekretion, wobei der stimulierende Effekt durch die beiden mehrfach ungesättigten Fettsäuren α -Linolen- und Docosahexaensäure bei sehr hohen Fettsäurekonzentrationen höher war als durch die Stimulation mit Ölsäure. Die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure hatte keinen stimulatorischen Einfluss auf die GLP-1 Ausschüttung aus den STC-1 Zellen (Abb. 3-14 A und B).

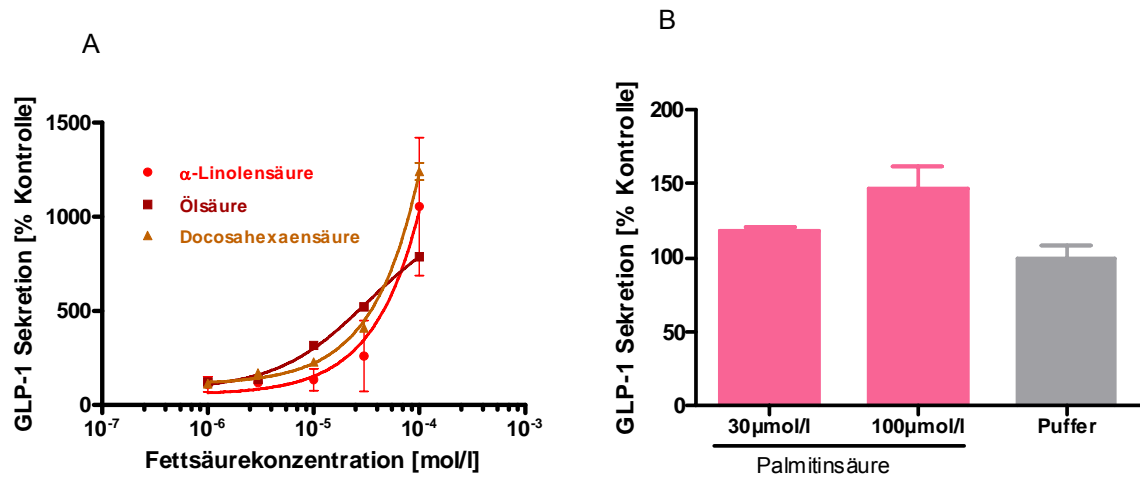


Abb. 3-14 A und B: Einfluss von α -Linolensäure, Ölsäure, Docosahexaensäure und Palmitinsäure auf die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwert \pm SEM. n= 3. (* EC_{50} (α -Linolensäure)= 96,1 μ mol/l, * EC_{50} (Ölsäure)= 3,3 μ mol/l, repräsentativ für n=5)

* EC_{50} : scheinbare EC_{50} Werte

Die Stimulierung der STC-1 Zellen mit dem GPR40 Agonisten C40a führte zu einer konzentrationsabhängigen GLP-1 Sekretion (Abb. 3-15). Da der Agonist spezifisch GPR40 aber nicht GPR120 aktiviert (vgl. Abb. 3-9 und 3-11), wurde gezeigt, dass über eine Aktivierung von GPR40 die GLP-1 Sekretion in vitro stimuliert wird.

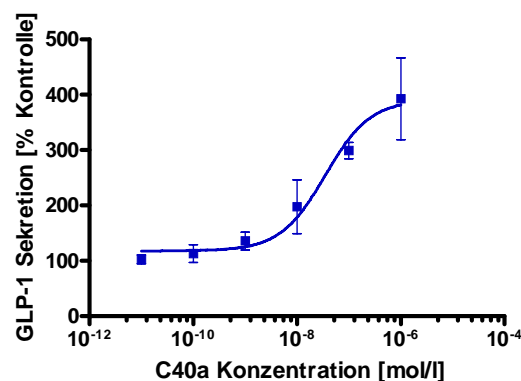


Abb. 3-15: Einfluss von C40a auf die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwert \pm SEM, n= 3. (EC_{50} (C40a)= 35 nmol/l, repräsentativ für n=5)

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu publizierten Daten von Hirasawa et al. [58], die mit Hilfe von GPR40 und GPR120 spezifischer siRNA zeigten, dass GPR120 nicht aber GPR40 die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen induziert.

Die Stimulation der GLP-1 Sekretion durch den GPR40 Agonisten führte zu der Frage, ob die fettsäureinduzierte GLP-1 Sekretion, vermittelt durch GPR40 und

GPR120, durch eine additive Stimulation mit dem GPR40 Agonisten zusätzlich erhöht werden kann. Dazu wurden die Zellen mit α -Linolensäure (30 $\mu\text{mol/l}$) und C40a (0,001-10 $\mu\text{mol/l}$) gemeinsam stimuliert. α -Linolensäure erhöhte die C40a-induzierte GLP-1 Sekretion additiv (Abb. 3-16 A und B).

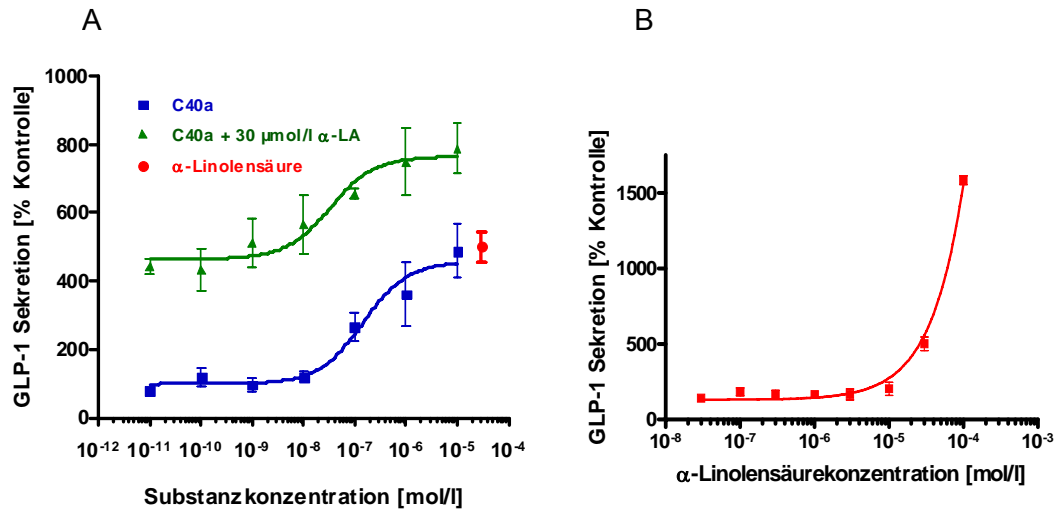


Abb.3-16 A und B: Einfluss von C40a in Kombination mit 30 $\mu\text{mol/l}$ α -Linolensäure auf die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwerte \pm SEM, n=3. (EC_{50} (C40a)= 98,1 nM, $^*EC_{50}$ (α -Linolensäure)= 50,0 mmol/l, EC_{50} (C40a + α -Linolensäure)= 33,5 nmol/l, repräsentativ für n=5). LA= α -Linolensäure.

$^*EC_{50}$: scheinbare EC_{50} Werte

Anschließend wurde überprüft, ob bei einer Gabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ α -Linolensäure in Kombination mit C40a auch noch eine verstärkte GLP-1 Sekretion zu beobachten ist, aber bei dieser Fettsäurekonzentration konnte mit C40a keine Erhöhung der Sekretion mehr erreicht werden. Vermutlich wird die GLP-1 Freisetzung durch 100 $\mu\text{mol/l}$ α -Linolensäure maximal stimuliert (Abb. 3-17).

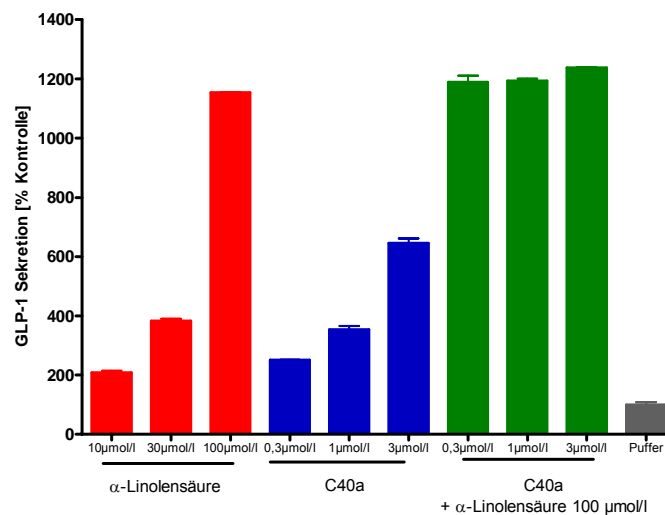


Abb. 3-17: Einfluss von C40a in Kombination mit 100 µmol/l α-Linolensäure auf die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwert ± SEM, n= 3 (repräsentativ für n=5).

Ein weiterer Nährstoff, der bei der GLP-1 Sekretion eine Rolle spielt, ist Glukose. Um die Wirkung von Glukose auf die GLP-1 Sekretion in vitro zu untersuchen, wurden die STC-1 Zellen mit Glukose (3, 10, 30 mmol/l) für 2 h in KRBH inkubiert und anschließend GLP-1 im Überstand bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Glukose die GLP-1 Ausschüttung stimuliert, jedoch ist die stimulatorische Wirkung des Monosaccharids geringer als die der Fettsäuren (Abb. 3-18).

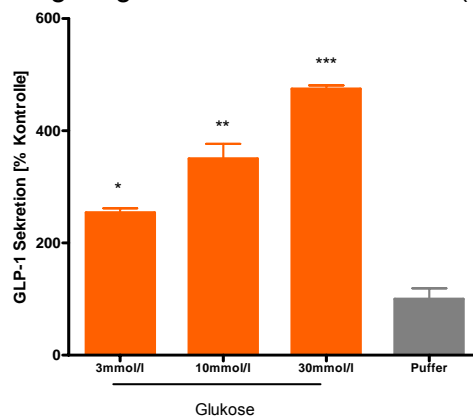


Abb. 3-18: Einfluss von Glukose auf die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen. Die Inkubation erfolgte über 2h in KRBH. Anschließend wurde GLP-1 aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwert ± SEM n= 3 (repräsentativ für n=5), *, p< 0,05, **, p< 0,01, ***, p< 0,005

Die Rolle des G_{α_s} -gekoppelten Rezeptors GPR119 bei der GLP-1 Sekretion aus den L-Zellen wurde ebenfalls *in vitro* untersucht. Die Zellen wurden mit dem unselektiven GPR119 Agonisten Oleyethanolamid (OEA) und mit dem selektiven Rezeptoragonisten C119 [117] stimuliert. Es wurde gezeigt, dass sowohl OEA wie auch C119 die GLP-1 Sekretion konzentrationsabhängig stimulierten (Abb. 3-19 A und B).

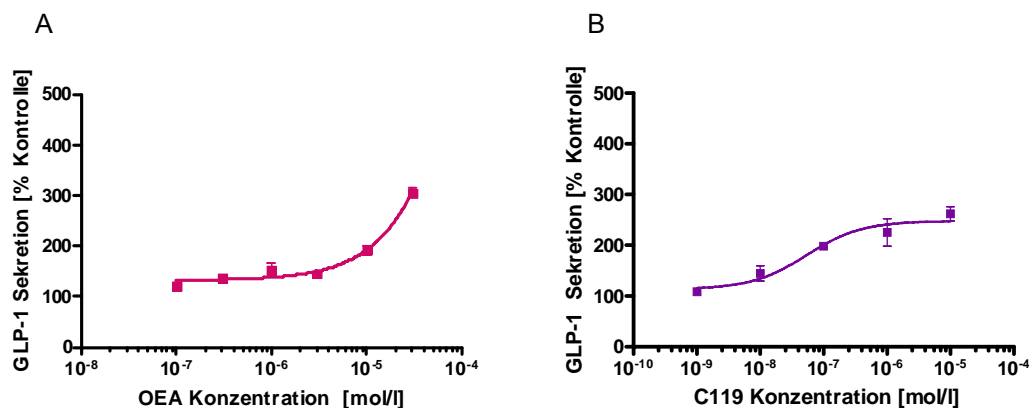


Abb. 3-19: A und B Einfluss der unselektiven und selektiven GPR119 Agonisten, OEA und C119, auf die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwert \pm SEM, (n= 3). (EC_{50} (C119)= 730,2 nmol/l, repräsentativ für n=5).

In GLUTag Zellen, einer weiteren murinen enteroendokrinen Zelllinie, wurde bereits gezeigt, dass synthetische GPR119 Agonisten die GLP-1 Sekretion *in vitro* stimulieren [59]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass OEA eine gleich hohe Effizienz aber eine schwächere Potenz als C119 zeigt, deshalb wurde für die Charakterisierung der Rolle und Signaltransduktionswege von GPR119 in L-Zellen und β -Zellen der synthetische GPR119 Agonist C119 verwendet.

Die Wirkung der gleichzeitigen Stimulierung der STC-1 Zellen mit C40a und C119, d.h. die zeitgleiche Aktivierung des G_{α_q} -gekoppelten Signaltransduktionsweges und der G_{α_s} -gekoppelten Signaltransduktionskaskade wurde anschließend untersucht. Um den möglichen additiven Effekt von GPR119 und GPR40/GPR120 in L-Zellen abschätzen zu können, wurden STC-1 Zellen mit 10 μ mol/l C119 und C40a zusammen stimuliert. C119 (10 μ mol/l) erhöhte die C40a induzierte GLP-1 Sekretion additiv (Abb. 3-20).

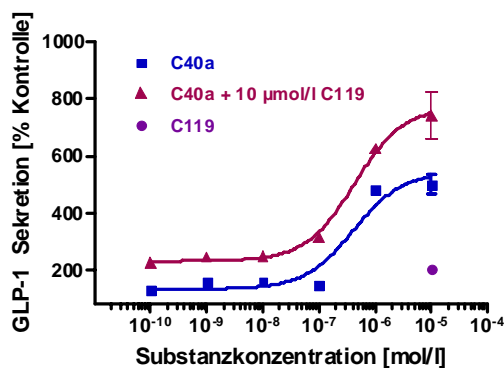


Abb. 3-20: Einfluss von C40a allein und in Kombination mit C119 auf die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. (EC_{50} (C40a)= 40,5 nmol/l, EC_{50} (C40a + C119)= 42,5 nmol/l, repräsentativ für $n=5$).

Mit Hilfe des STC-1 Zellmodells konnte somit gezeigt werden, dass GPR40, GPR119 und höchstwahrscheinlich auch GPR120 die GLP-1 Sekretion beeinflussen. Die Effizienz des GPR40 Agonisten C40a auf die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen ist nur halb so hoch verglichen mit den natürlichen Agonisten α -Linolensäure, Ölsäure oder Docosahexaensäure, was darauf hindeutet, dass C40a nur ein partieller GPR40 Agonist ist, es sei denn die höhere Effizienz der Fettsäuren ist GPR120 vermittelt.

Darüber hinaus ist die C119 induzierte maximale GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen nur halb so hoch wie die C40a vermittelte GLP-1 Sekretion. Somit scheint die GLP-1 Freisetzung durch den G_{α_q} -gekoppelten Signaltransduktionsweg effizienter stimuliert zu werden als durch den G_{α_s} -gekoppelten Signalweg. Die C40a induzierte GLP-1 Sekretion wurde durch C119 additiv erhöht, d.h. der G_{α_q} -gekoppelte Signaltransduktionsmechanismus scheint durch den G_{α_s} -gekoppelten Signaltransduktionsmechanismus verstärkt zu werden. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde in weiteren Versuchen der Einfluss der beiden unterschiedlichen Signaltransduktionswege mit Hilfe zweier G-Protein unabhängiger Aktivatoren untersucht. Innerhalb des G_{α_q} -gekoppelten Signaltransduktionsweges aktiviert DAG die Proteinkinase C, dadurch wird über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration die GLP-1 Sekretion erhöht. Mit Hilfe von Phorbolmyristatacetat (PMA) wird die Proteinkinase C aktiviert, somit wird die GLP-1 Sekretion DAG-unabhängig stimuliert (vgl. 1.4). Forskolin ist ein Aktivator der Adenylatzyklase, folglich wird über die Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration der G_{α_s} -gekoppelte Signalweg, an dessen Ende eine Stimulierung der GLP-1 Sekretion steht, rezeptorunabhängig stimuliert (vgl. 1.4).

Die Stimulation der STC-1 Zellen mit PMA führte bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ zu einer 6-fachen Erhöhung der basalen GLP-1 Sekretion (Abb. 3-13 A). Eine Aktivierung der Zellen mit Forskolin führte bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ hingegen zu einer 3-fachen Erhöhung der basalen GLP-1 Ausschüttung (Abb. 3-21 B). Somit konnte rezeptorunabhängig bestätigt werden, dass die GLP-1 Sekretion über den G_{α_q} -gekoppelten Signaltransduktionsweg effizienter stimuliert werden kann als über den G_{α_s} -gekoppelten Signaltransduktionsweg.

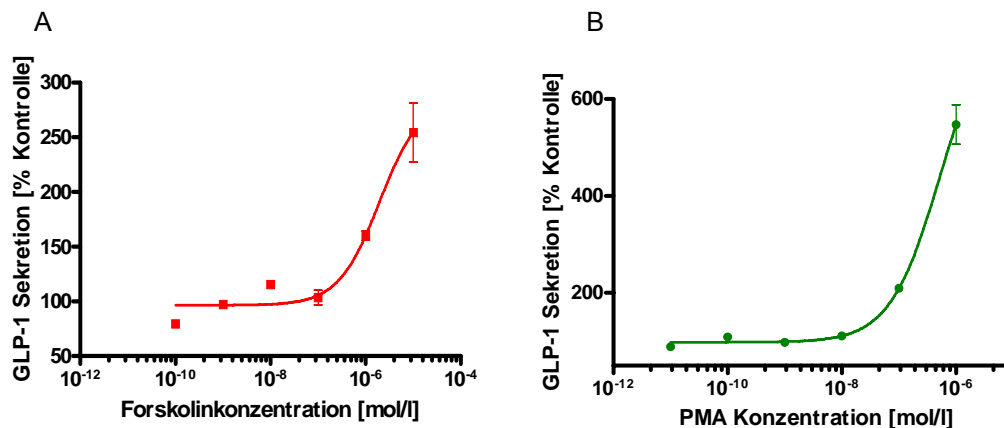


Abb. 3-21 A und B: Einfluss von Forskolin und PMA auf die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. (* EC_{50} (Forskolin)= 1964 nmol/l, * EC_{50} (PMA)= 521 nmol/l, repräsentativ für $n=5$).

* EC_{50} : scheinbare EC_{50} Werte

In einem weiteren Ansatz wurden die STC-1 Zellen mit PMA und 1 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin costimuliert. Die PMA-induzierte GLP-1 Sekretion konnte durch Forskolin additiv erhöht werden (Abb. 3-22).

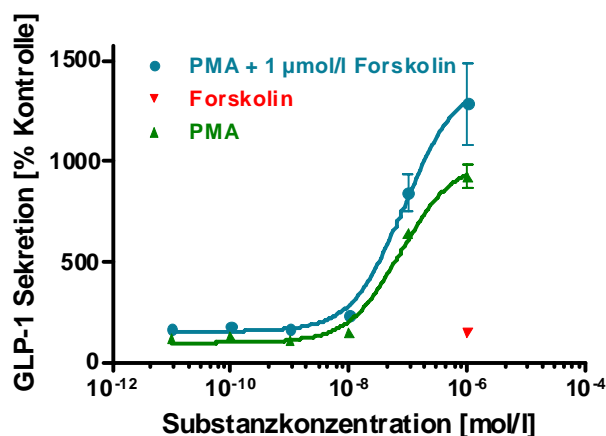


Abb. 3-22: Einfluss von PMA und Forskolin (1 $\mu\text{mol/l}$) auf die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. (EC_{50} (PMA)= 104,17 nmol/l, EC_{50} (PMA + Forskolin)= 124,39 nmol/l, repräsentativ für $n=5$).

Somit konnte G-Protein unabhängig gezeigt werden, dass die GLP-1 Sekretion über die PKC-Aktivierung stimuliert wird und additiv durch die Adenylatzyklase-cAMP-

Signaltransduktion verstärkt werden kann. Die GLP-1 Sekretionsstudien in vitro zeigten folglich, dass die Aktivierung von GPR40 und GPR120, die in L-Zellen im Darm exprimiert werden, durch selektive und unselektive Rezeptoragonisten über die Induktion des $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Signaltransduktionsweges die GLP-1 Sekretion stimulieren. Der $G_{\alpha s}$ -gekoppelte Rezeptor GPR119 spielt bei der GLP-1 Sekretion aus L-Zellen in vitro ebenfalls eine Rolle, wobei die Aktivierung des Rezeptors die GPR40 und GPR120 induzierte GLP-1 Sekretion amplifiziert.

3.5.2 GLP-1 Freisetzung aus Rattenkolon

Nachdem in vitro gezeigt werden konnte, dass die GLP-1 Ausschüttung über GPR40, GPR119 und GPR120 aber auch GPCR-unabhängig durch PMA und Forskolin stimuliert werden kann, wurden diese Ergebnisse anschließend in ex vivo Experimenten verifiziert. Für die Untersuchung der funktionellen Bedeutung der drei Rezeptoren und deren Signaltransduktionskaskaden wurde ein ex vivo Rattenkolonmodell etabliert, da alle drei Rezeptoren in den L-Zellen des Rattenkolons exprimiert werden. Wistar Ratten wurden über Nacht gefastet. Am folgenden Tag wurde der Kolon der Ratten entnommen. Dieser wurde in etwa 2 cm große Stücke geteilt, längs aufgeschnitten und die Mukosa, sofern nötig, äußerst vorsichtig, von restlichem Kot befreit. Nachdem diese Darmabschnitte in kleinere Darmstücke mit einer Größe von ca. 4x5 mm geschnitten und deren Gewicht bestimmt wurde, wurden sie mit GPCR-Agonisten verschiedener Konzentrationen stimuliert. Dieses Modell sollte dazu dienen, ein besseres Verständnis der physiologischen GLP-1 Sekretion, induziert durch GPR40, GPR119 und GPR120, zu erlangen.

Die Stimulation der Kolonpräparate mit α -Linolensäure, Docosahexaensäure und Ölsäure führte zu einer konzentrationsabhängigen GLP-1 Ausschüttung (Abb. 3-23 A und B).

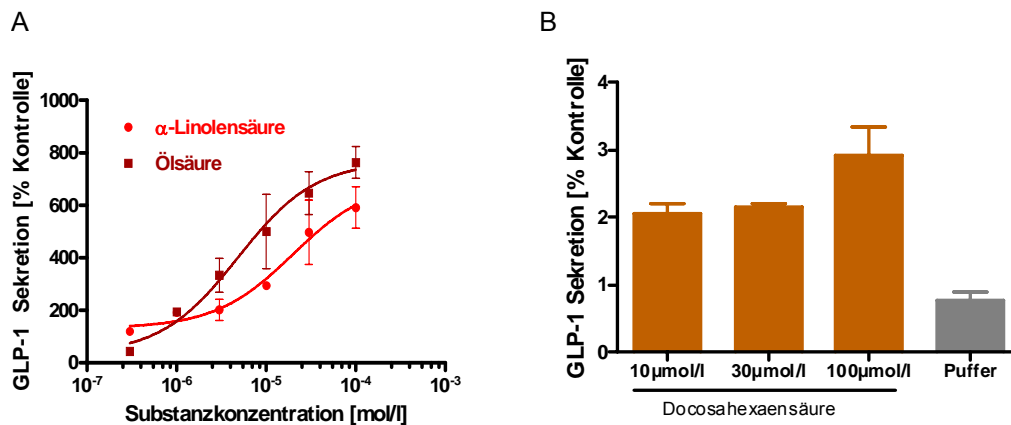


Abb. 3-23 A und B: Einfluss von α -Linolensäure, Ölsäure und Docosahexaensäure auf die GLP-1 Sekretion in Rattenkolon. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwert \pm SEM, n= 3. (*EC₅₀ (α -Linolensäure)= 19,9 μ mol/l, *EC₅₀ (Ölsäure)= 4,8 μ mol/l, repräsentativ für n=5).

*EC₅₀: scheinbare EC₅₀ Werte

In einem weiteren Ansatz wurde der Einfluss verschiedener GPR40 Agonisten auf die GLP-1 Sekretion in diesem ex vivo Modell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche GPR40 Agonisten (C40a, C40b und C40c) die GLP-1 Ausschüttung konzentrationsabhängig stimulieren (Abb. 3-24).

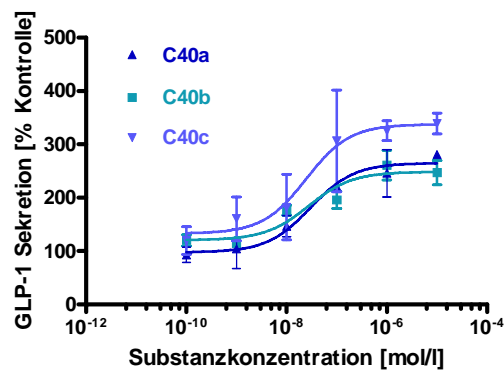


Abb. 3-24: Einfluss von GPR40 Agonisten auf die GLP-1 Sekretion in Rattenkolon. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwert \pm SEM, n=3. (EC₅₀ (C40a)= 29,9 nmol/l, EC₅₀ (C40b)= 27,5 nmol/l, EC₅₀ (C40c)= 24,7 nmol/l; repräsentativ für n= 5).

Somit konnte auch ex vivo im Gegensatz zu den Daten zu Hirasawa et al. (2005) gezeigt werden, dass GPR40 bei der GLP-1 Sekretion im Darm eine Rolle spielt. Die GLP-1 Freisetzung konnte außerdem durch den endogenen GPR119 Agonisten OEA und den synthetischen GPR119 Agonisten C119 stimuliert werden. Die konzentrationsabhängige Hormonausschüttung, stimuliert durch C119, war genauso effizient wie die GLP-1 Sekretion, stimuliert durch die GPR40 Agonisten C40a (Abb. 3-25 A und B).

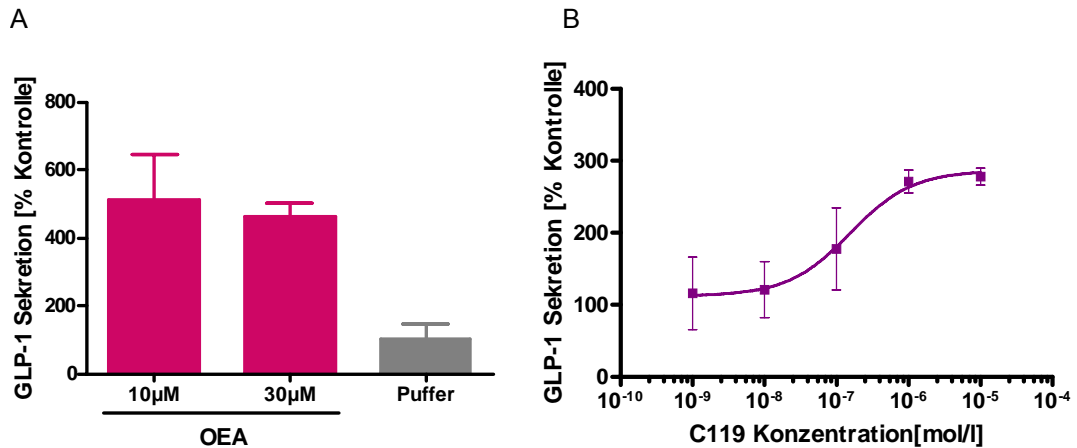


Abb. 3-25 A und B: Einfluss von OEA und C119 auf die GLP-1 Sekretion im Rattenkolon. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwert \pm SEM, n=3. (EC₅₀(C119)= 25 nmol/l, repräsentativ für n= 5).

Folglich konnte mit Hilfe dieses ex vivo Modells bestätigt werden, dass GPR40, GPR119 und höchstwahrscheinlich auch GPR120 bei der GLP-1 Sekretion in L-Zellen eine wesentliche Rolle spielen.

Die Stimulation der Kolonstücke mit Glukose wurde ebenfalls untersucht. Glukose stimulierte die GLP-1 Freisetzung aus den Rattenkolonstücken konzentrationsabhängig (Abb. 3-26).

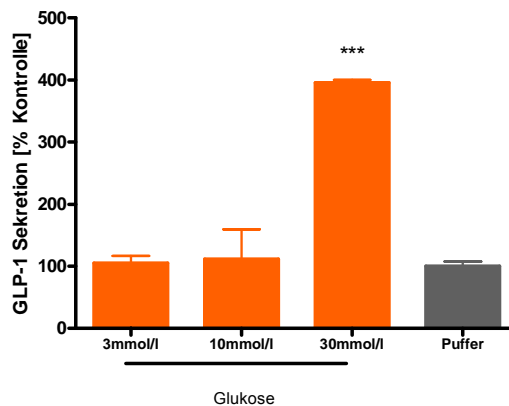


Abb. 3-26: Einfluss von Glukose auf die GLP-1 Sekretion in Rattenkolon. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwert \pm SEM n= 3 (repräsentativ für n=5). ***, p < 0,0001

Um zu untersuchen, ob im ex vivo Modell α -Linolensäure (30 μ mol/l) die C40a induzierte GLP-1 Sekretion erhöht, wurden die Kolonstücke mit α -Linolensäure und C40a costimuliert (Abb. 3-27) und anschließend der Gehalt an GLP-1 im Überstand bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass 30 μ mol/l α -Linolensäure die C40a induzierte GLP-1 Sekretion erhöht (Abb.3-27).

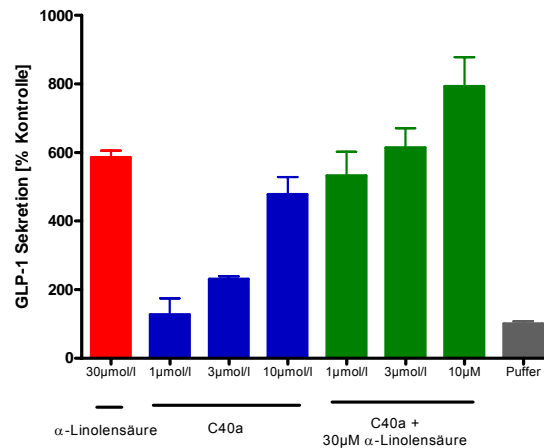


Abb. 3-27: Einfluss von α -Linolensäure auf die C40a induzierte GLP-1 Sekretion im Rattenkolon. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwert \pm SEM, n= 3 (repräsentativ für n=5).

In STC-1 Zellen wurde Rezeptorunabhängig gezeigt, dass die GLP-1 Sekretion, ausgelöst durch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration über die Aktivierung der Proteinkinase C verstärkt werden kann, indem die intrazelluläre cAMP Konzentration erhöht wird. Rezeptorunabhängig wurde dieses Ergebnis durch den Proteinkinase C Aktivator PMA und den Adenylatzyklase Aktivator Forskolin bestätigt (vgl. 3.5.1 Abb. 3-22). Konform zu den in vitro Versuchen wurden Rattenkolonstücke mit dem Proteinkinase C Aktivator PMA alleine und in Kombination mit dem Adenylatzyklase Aktivator Forskolin (1 μ mol/l) stimuliert. Im ex vivo Darmmodell konnte die PMA induzierte GLP-1 Sekretion durch Forskolin additiv erhöht werden. Somit konnte auch ex vivo Rezeptorunabhängig gezeigt werden, dass eine PKC-Aktivierung durch eine erhöhte cAMP Konzentration verstärkt werden kann (Abb. 3- 28).

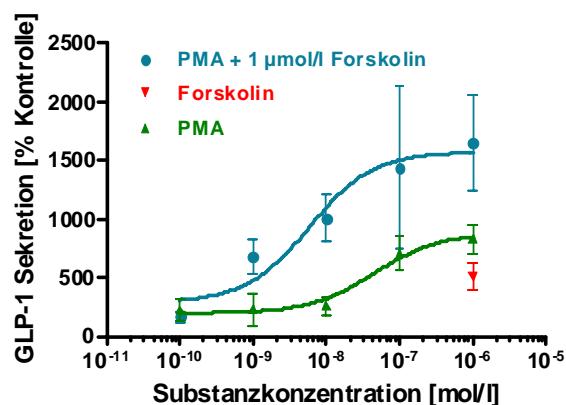


Abb. 3-28: Einfluss von PMA und Forskolin (1 μ mol/l) auf die GLP-1 Sekretion im Rattenkolon. GLP-1 wurden aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwert \pm SEM, n= 3. (EC_{50} (PMA)= 45 nmol/l, EC_{50} (PMA+Forskolin)= 5,9 nmol/l, repräsentativ für n=5).

Anschließend wurde überprüft, ob eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, rezeptorabhängig die DAG/ IP₃ induzierte GLP-1 Sekretion ex vivo amplifiziert. Die Rattenkolonstücke wurden mit C40a und mit C40a in Kombination mit C119 stimuliert. Die C40a induzierte GLP-1 Sekretion wurde durch C119 additiv erhöht, d.h. der GPR119-gekoppelte Signaltransduktionsmechanismus verstärkt die G_{αq}-induzierte GLP-1 Sekretion (Abb. 3-29).

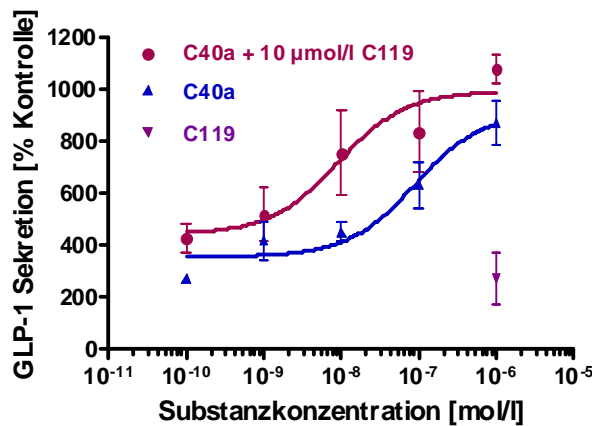


Abb. 3-29: Einfluss von C40a und C119 (10 µmol/l) auf die GLP-1 Sekretion in Rattenkolon. GLP-1 wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert. Werte als Mittelwert ± SEM, n= 3. (EC₅₀(C40a)= 89,8 nmol/l, EC₅₀(C40a + C119)= 9,1 nmol/l, repräsentativ für n=5).

Folglich wurden die in vitro Ergebnisse in den ex vivo Experimenten verifiziert. Die drei GPCRs GPR40, GPR120 und GPR119, die in den L-Zellen im Darm exprimiert werden, stimulieren die GLP-1 Sekretion in vitro wie auch ex vivo, wobei GPR119 die G_{αq}-induzierte Inkretinausschüttung amplifiziert.

3.6 Proliferationsuntersuchungen in STC-1 Zellen

In den bisher durchgeführten Experimenten wurde gezeigt, dass GPR40, GPR119 und GPR120, die in den L-Zellen im Darm lokalisiert sind, die GLP-1 Sekretion stimulieren und dass GPR40 und GPR120 über den G_{αq}-gekoppelten Signalweg die Hormonsekretion aktivieren. In folgenden Experimenten sollte nun überprüft werden, ob die Rezeptoren weitere Signaltransduktionskaskaden und damit die Funktion der L-Zellen beeinflussen. Deshalb wurde die Rolle der drei Rezeptoren bei der Phosphorylierung zweier Signalmoleküle, ERK1/2 und Akt, von denen bekannt ist, dass sie über GPCRs aktiviert werden können [148], in den STC-1 Zellen untersucht. Die Phosphorylierung der Signalmoleküle ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) und Akt/PKB (Proteinkinase B) spielt innerhalb der Signaltransduktionskaskaden, die eine Zellproliferation nach sich ziehen, bei einer

Vielzahl unterschiedlicher Zellen eine wesentliche Rolle. In den pankreatischen β -Zellen führt eine Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt zu einer erhöhten Zellproliferation. Die Aktivierung von ERK1/2 und Akt und die involvierten Signaltransduktionskaskaden in der β -Zelle wurden in der Vergangenheit detailliert untersucht (vgl. 1.5), wohingegen in der L-Zelle über diese Mechanismen noch wenig bekannt ist. Mit Hilfe des STC-1 L-Zellmodells wurde deshalb in den folgenden Experimenten untersucht, ob die Aktivierung von ERK1/2 und Akt über GPR40, GPR119 und GPR120 beeinflusst werden können. Parallel dazu wurde der Einfluss von selektiven und unselektiven GPR40, GPR119 und GPR120 Agonisten auf die Zellproliferation in STC-1 Zellen untersucht, indem die DNA-Synthese mit Hilfe der [14 C]-Thymidineinbaumethode gemessen wurde.

3.6.1 Untersuchung der ERK1/2 Phosphorylierung in STC- 1 Zellen

Die ERK1/2 Phosphorylierung kann durch eine Reihe von GPCRs durch die Aktivierung des Ras/ Raf/ MEK Signalweges stimuliert werden [148]. In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung eines AlphaScreen SureFire ERK-Assays in STC-1 Zellen zunächst überprüft, ob GPR40, GPR119 und GPR120 neben der GLP-1 Sekretion auch den ERK1/2 Signalweg beeinflussen.

Es wurde untersucht, ob langkettige ungesättigte Fettsäuren, sowie der GPR40 Agonist C40a und der GPR119 Agonist C119 die ERK1/2-Phosphorylierung stimulieren. α -Linolensäure, Docosahexaensäure, Ölsäure und C40a stimulierten die ERK1/2-Phosphorylierung konzentrationsabhängig, wobei die Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation vom Sättigungsgrad der Fettsäuren abhängt. C119 zeigte keinen Einfluss auf die ERK1/2 Phosphorylierung (Abb. 3- 30).

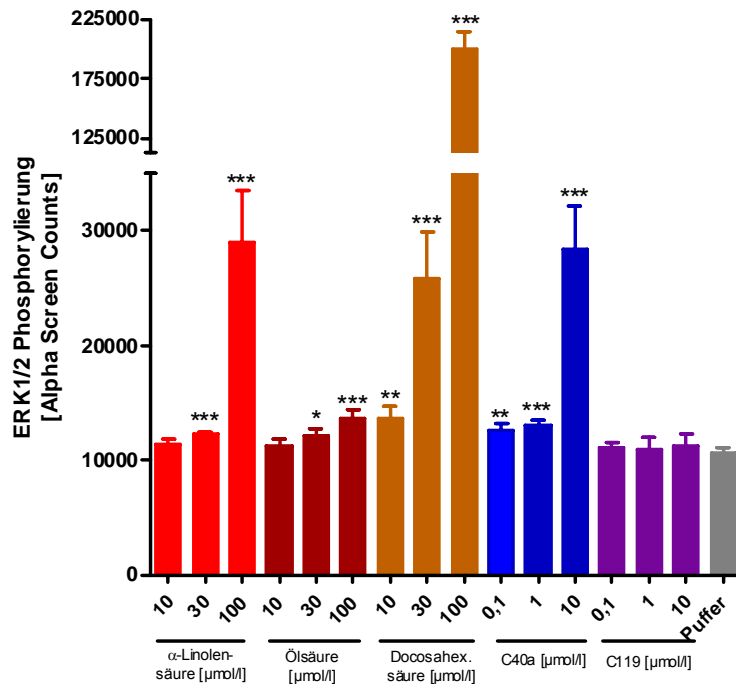


Abb. 3-30: ERK1/2-Phosphorylierung in STC-1 Zellen nach Stimulierung mit den Fettsäuren α -Linolensäure, Ölsäure und Docosahexaensäure sowie dem GPR40 Agonisten C40a und dem GPR119 Agonisten C119. Werte angegeben in Alpha Screen Counts \pm SD n= 4 (repräsentativ für n=3). *, p< 0,05, **, p< 0,005, *** p< 0,001

Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurden diese Ergebnisse bestätigt. Die STC-1 Zellen wurden für 2 Tage ausgesät und 2 h vor Versuchsbeginn FKS-frei (mit 0,5 % BSA) kultiviert. Anschließend wurden sie 5 min mit α -Linolensäure, Docosahexaensäure, C40a und C119 behandelt. Die Western Blot Analyse zeigte, dass α -Linolensäure (100 μ mol/l), Docosahexaensäure (100 μ mol/l) und C40a (10 μ mol/l) die ERK1/2-Phosphorylierung stimulieren, wobei α -Linolen- und Docosahexaensäure die Phosphorylierung weitaus stärker stimulieren als C40a. Keinen Einfluss auf die ERK1/2-Phosphorylierung zeigte C119 (Abb. 3-31).

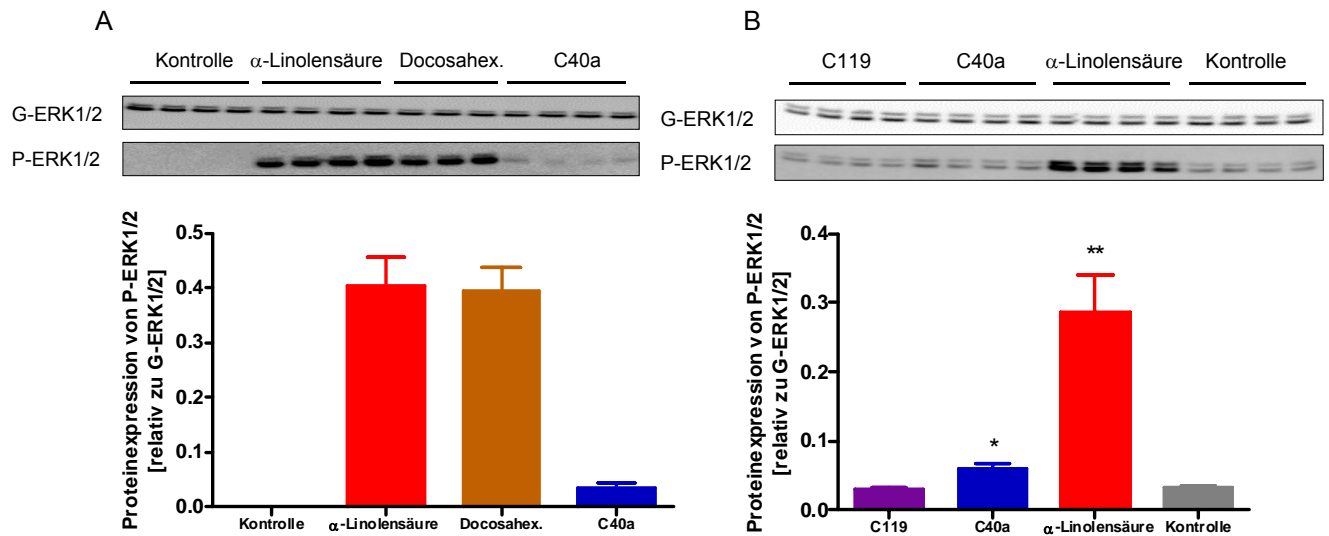


Abb. 3-31 A und B: ERK1/2-Phosphorylierung in STC-1 Zellen. Western Blot Analyse mit den G-ERK1/2 (Gesamt-ERK) und P-ERK1/2 (Phospho-ERK1/2) (42/44 kDa) Antikörpern. Der Abgleich des P-ERK1/2 Antikörpers erfolgte mit G-ERK1/2. Werte als Mittelwerte \pm SEM, n=4 (repräsentativ für n=3). (Docosahex.: Docosahexaensäure), *, $p < 0,05$, **, $p < 0,005$

Diese Ergebnisse zeigen, dass α -Linolensäure und Docosahexaensäure und der GPR40 Agonist C40a nicht nur die GLP-1 Sekretion aus den L-Zellen stimulieren, sondern auch die Phosphorylierung von ERK1/2 erhöhen. Keinen Einfluss auf die ERK1/2- Phosphorylierung zeigte dagegen C119, was darauf hinweist, dass die GPR119 induzierte Aktivierung des G_{α_s} -gekoppelten Signalweges die Phosphorylierung von ERK1/2 nicht beeinflusst.

3.6.2 Untersuchung der Akt-Phosphorylierung in STC-1 Zellen

Die Phosphorylierung von Akt kann durch Rezeptortyrosinkinasen oder GPCRs stimuliert werden [147]. Entsprechend den Experimenten bezüglich der ERK1/2 Phosphorylierung wurde überprüft, ob GPR40, GPR119 und GPR120 die Akt-Phosphorylierung in STC-1 Zellen beeinflussen.

Die Zellen wurden über zwei Tage ausgesät, am zweiten Tag wurden die Zellen zunächst 2 h FKS-frei (Medium enthielt 0,5 % BSA) kultiviert und anschließend mit α -Linolensäure, C40a und Insulin 10 min behandelt. In der Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass α -Linolensäure (100 $\mu\text{mol/l}$), C40a (100 $\mu\text{mol/l}$) und Insulin (10 nmol/l) die Akt-Phosphorylierung stimulieren (Abb. 3-32).

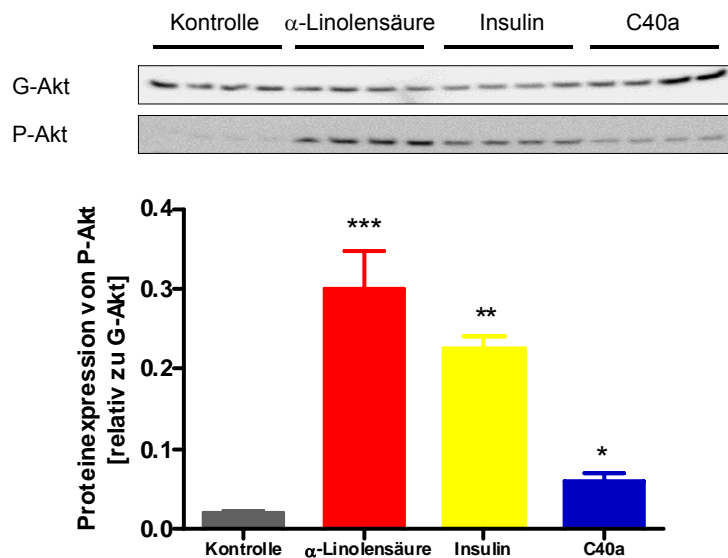


Abb. 3-32: Akt-Phosphorylierung in STC-1 Zellen. Western Blot Analyse mit den G-Akt (Gesamt-Akt) und P-Akt (Phospho-Akt) (60 kDa) Antikörpern. Der Abgleich des P-Akt Antikörpers erfolgte durch G-Akt. Werte als Mittelwerte \pm SEM, n=4 (repräsentativ für n=3). *, $p < 0,05$, **, $p < 0,005$, *** $p < 0,001$

Folglich konnte in vitro gezeigt werden, dass GPR40 und GPR120 neben der GLP-1 Sekretion weitere Signaltransduktionskaskaden aktivieren, so den Ras/ Raf/ MEK/ ERK1/2 und den PI3K/ Akt Signalwege.

3.6.3 [^{14}C]-Thymidineinbau in STC-1 Zellen

Da die Aktivierung von ERK1/2 und von Akt bei der Zellproliferation und Zellapoptose eine wichtige Rolle spielt [103, 147], wurde der Einfluss von GPR40, GPR119 und GPR120 auf die Proliferation von L-Zellen in vitro untersucht, indem die Zellen mit α -Linolensäure, Docosahexaensäure, C40a und C119 stimuliert wurden und die DNA-Synthese mit Hilfe der [^{14}C]-Thymidineinbaumethode gemessen wurde. α -Linolensäure, Docosahexaensäure und C40a stimulierten den [^{14}C]-Thymidineinbau konzentrationsabhängig, wobei C119 keinen Einfluss auf den Einbau des radioaktivmarkierten Thymidins zeigte (Abb. 3- 33 und 3-34).

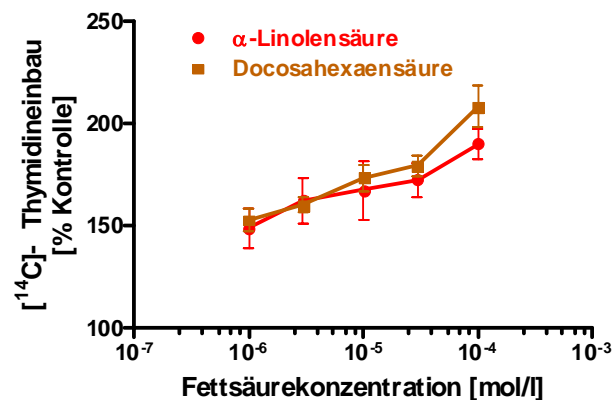


Abb. 3- 33: [^{14}C]-Thymidineinbau in STC-1 Zellen. Die Zellen wurden 22 h mit [^{14}C]-Thymidin inkubiert und mit den Fettsäuren α -Linolensäure und Docosahexaensäure stimuliert. Der [^{14}C]-Thymidineinbau ist als % Kontrolle dargestellt. Werte als Mittelwerte \pm SEM, n=4. (repräsentativ für n=3).

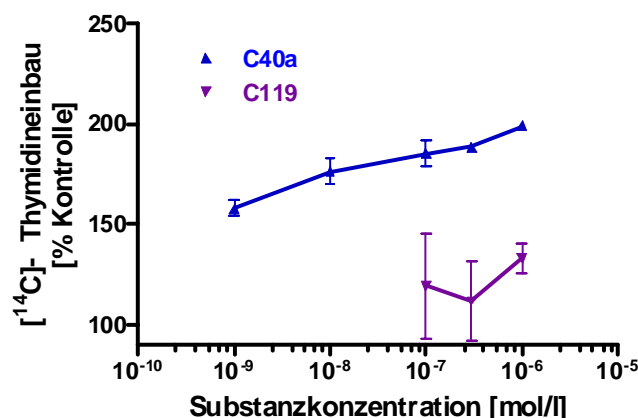


Abb. 3- 34: [^{14}C]-Thymidineinbau in STC-1 Zellen. Die Zellen wurden 22 h mit [^{14}C]-Thymidin inkubiert und mit den Substanzen C40a und C119 stimuliert. Der [^{14}C]-Thymidineinbau ist als % Kontrolle dargestellt. Werte als Mittelwerte \pm SEM, n=4. (repräsentativ für n=3).

Somit wurde gezeigt, dass die Aktivierung der GPR40- und GPR120-gekoppelten Signaltransduktionswege in L-Zellen nicht nur die GLP-1 Sekretion stimulieren,

sondern in vitro auch bei der Aktivierung weitere Signalwege involviert sind, so bei der Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt sowie bei der Proliferation der Zellen.

3.7 Untersuchung der Apoptose in STC-1 Zellen durch Messung der Caspase-3 Aktivität

Nachdem im STC-1 L-Zellmodell gezeigt werden konnte, dass GPR40 und GPR120 die Proliferation der Zellen stimulieren, wurde der Einfluss der GPR40 und GPR120 Rezeptoragonisten α -Linolensäure und C40a auf die staurosporin-, palmitinsäure- und TNF- α -induzierte Apoptose in STC-1 Zellen untersucht. Caspase-3 ist ein typischer Apoptosemarker und ist in vielen Zellen für die Apoptoseinduktion verantwortlich [114]. Dabei wird die inaktive Caspase-3 (36 kDa großes Protein) durch eine proteolytische Spaltung in die aktiven Caspase-3 Fragmente (17 und 19 kDa große Fragmente) gespalten, die die Zellapoptose hervorrufen. In der folgenden Western Blot Analyse wurde das 17 kDa große Caspase-3 Fragment immunologisch detektiert.

Die STC-1 Zellen wurden über zwei Tage ausgesät und anschließend 2 h FKS-frei (0,5 % BSA) kultiviert und anschließend 6 h mit Staurosporin (0,1 $\mu\text{mol/l}$), TNF- α (10 ng/ml), Palmitinsäure (500 $\mu\text{mol/l}$) \pm α -Linolensäure (100 $\mu\text{mol/l}$) bzw. C40a (10 $\mu\text{mol/l}$) oder α -Linolensäure (100 $\mu\text{mol/l}$) bzw. C40a (10 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Das kurze aktive Caspase-3 Fragment konnte in den Zellen, die mit Staurosporin \pm α -Linolensäure oder C40a behandelt wurden, nachgewiesen werden. Keine Caspase-3 Aktivität zeigten dagegen unbehandelte Zellen sowie die Zellen, die mit α -Linolensäure bzw. C40a behandelt wurden. Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Staurosporin und α -Linolensäure bzw. C40a führte zu einer verminderten Caspase-3 Aktivität im Vergleich zu den Zellen, die nur mit Staurosporin behandelt wurden (Abb. 3- 35). Dieses Ergebnis zeigte, dass 100 $\mu\text{mol/l}$ α -Linolensäure und 10 $\mu\text{mol/l}$ C40a die L-Zellen vor Apoptose in vitro schützen können.

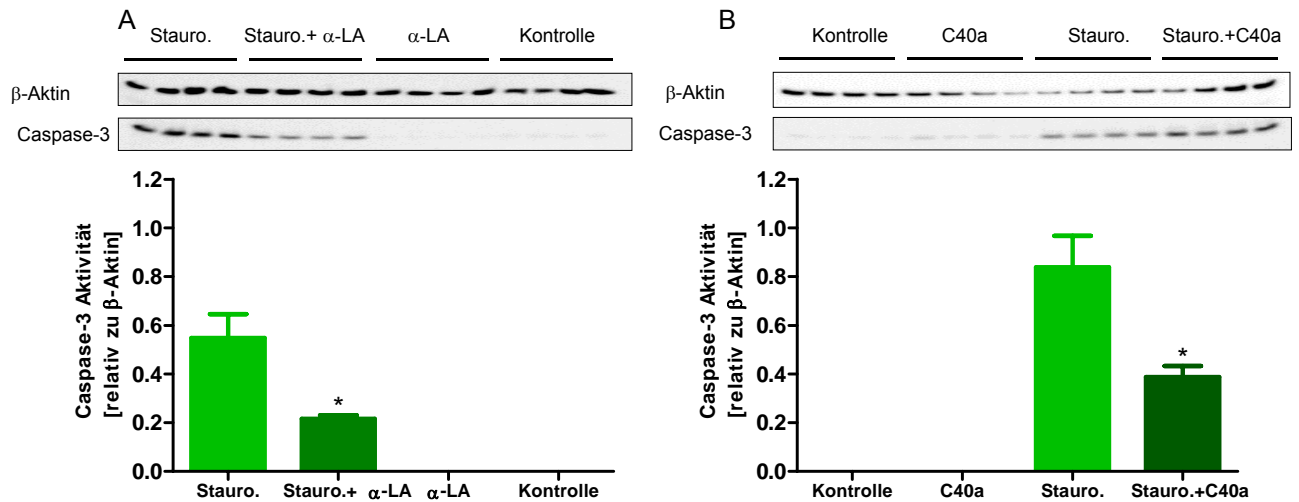


Abb. 3- 35 A und B: Caspase-3 Aktivierung in STC-1 Zellen. Western Blot Analyse mit den β-Aktin (43 kDa) und cleaved Caspase-3 (17 kDa) Antikörpern. Der Abgleich des Caspase-3 Antikörpers erfolgte mit dem Aktin-Antikörper. Die STC-1 Zellen wurden mit α-Linolensäure bzw. C40a, mit Staurosporin ± α-Linolensäure bzw. C40a behandelt und dann die Caspase-3 Aktivierung gemessen. Die Behandlung wurde über 6 h durchgeführt, Werte als Mittelwerte ± SEM, n=4. (repräsentativ für n=3). (α-LA: Linolensäure, Stauro.: Staurosporin) *, p< 0,05

Eine Behandlung der STC-1 Zellen mit TNF-α ± α-Linolensäure bzw. C40a zeigte ebenfalls, dass die durch TNF-α herbeigeführte Apoptose durch eine zusätzliche Behandlung mit α-Linolensäure bzw. C40a vermindert werden kann (Abb. 3-30). Jedoch konnte die durch TNF-α herbeigeführte Apoptose durch α-Linolensäure und C40a weniger stark vermindert werden als die durch Staurosporin herbeigeführte Apoptose in Abb. 3- 37.

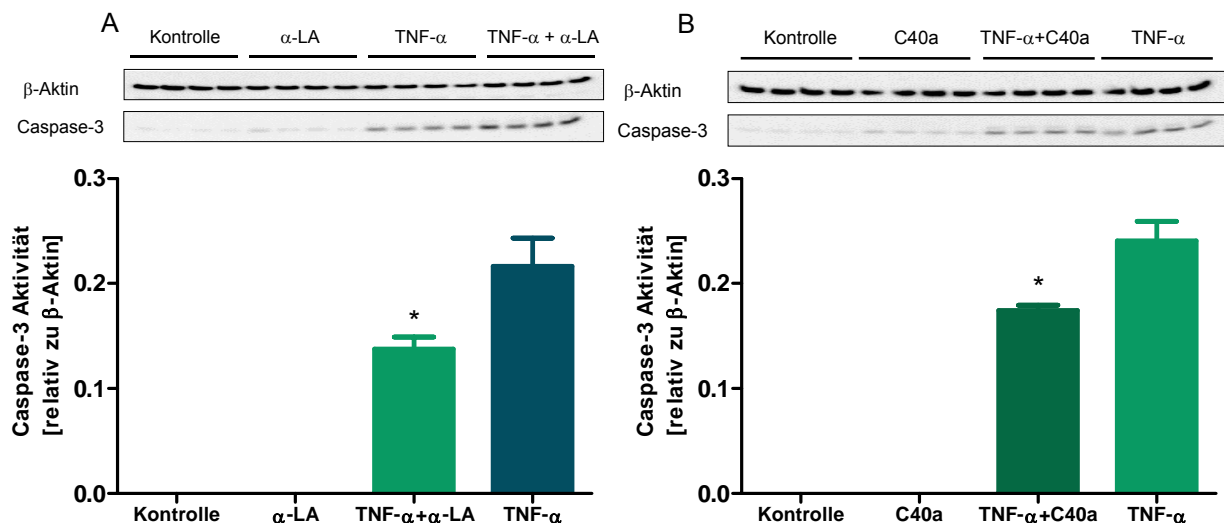


Abb. 3- 37: Caspase-3 Aktivierung in STC-1 Zellen. Western Blot Analyse mit den β-Aktin (43 kDa) und cleaved Caspase-3 (17 kDa) Antikörpern. Der Abgleich des Caspase-3 Antikörpers erfolgte mit dem Aktin-Antikörper. Die STC-1 Zellen wurden mit α-Linolensäure bzw. C40a, mit TNF-α ± α-Linolensäure bzw. C40a behandelt und dann die Caspase-3 Aktivierung gemessen. Die Behandlung wurde über 6 h durchgeführt, Werte als Mittelwerte ± SEM, n=4. (repräsentativ für n=3) (α-LA: Linolensäure), *, p< 0,05

Schließlich wurde untersucht, ob durch Palmitinsäure (500 $\mu\text{mol/l}$) die Apoptose in STC-1 Zellen angeregt werden kann und ob der Apoptose durch die zusätzliche Behandlung mit α -Linolensäure entgegengewirkt werden kann. Die Versuche zeigten, dass durch die Behandlung mit Palmitinsäure die Caspase-3 Aktivität nur sehr schwach erhöht wird und dass diese bei der gemeinsamen Behandlung mit α -Linolensäure nicht mehr messbar ist. Somit wirkt α -Linolensäure der palmitinsäureinduzierten Apoptose in STC-1 Zellen entgegen (Abb.3-38).

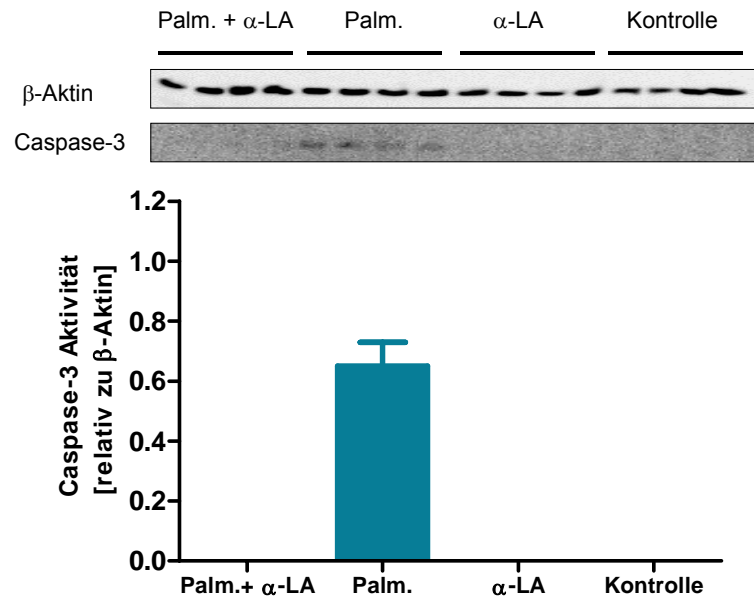


Abb. 3- 38: Caspase-3 Aktivierung in STC-1 Zellen. Western Blot Analyse mit den β -Aktin (43 kDa) und cleaved Caspase-3 (17 kDa) Antikörpern. Der Abgleich des Caspase-3 Antikörpers erfolgte mit dem Aktin-Antikörper. Die STC-1 Zellen wurden mit α -Linolensäure, mit Palmitinsäure \pm α -Linolensäure behandelt und dann die Caspase-3 Aktivierung gemessen. Die Behandlung wurde über 6 h durchgeführt. Werte als Mittelwerte \pm SEM, n=4. (repräsentativ für n=3). (α -LA: Linolensäure, Palm.: Palmitinsäure)

Folglich konnte gezeigt werden, dass GPR40 und GPR120 nicht nur die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt sowie die L-Zellproliferation aktivieren, sondern auch Signaltransduktionskaskaden aktivieren, die der cytotoxininduzierten Zellapoptose in vitro entgegenwirken.

3.8 Untersuchung der Expression verschiedener Gene in β -Zelllinienmodellen und Ratteninseln

Analog zu den L-Zellen wurde auch in den β -Zellen eine mRNA-Expressionsanalyse G-Protein gekoppelter Rezeptoren durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass GPR40, GPR119 und GPR120 in den murinen Insulinomazellen Min6c4 exprimiert werden. Der Expressionsspiegel von GPR40 war am höchsten, gefolgt von GPR119 und die GPR120-Genexpression war am niedrigsten. In den Ratteninsulinomazellen INS-1E werden GPR40 und GPR119 exprimiert, nicht nachweisbar war eine Expression von GPR120 (Tab. 3-3).

	GPR40	GPR119	GPR120
Min6c4	1,3	0,4	0,2
INS-1E	0,9	1,2	n.d.

Tab. 3-3 Real-Time PCR zum Nachweis von GPR40, GPR119 und GPR120 in INS-1E und Min6c4 Zellen. Die Expression der Gene in der Zelllinie wurde in Relation zu GAPDH gesetzt.

In den isolierten Langerhans'schen Inseln von Ratten (Ratteninseln) wurde die Expression von GPR40, GPR119 und GPR120 mit der Expression dieser Rezeptoren im Rattendarm verglichen. In Tabelle 3-4 ist die Expression der unterschiedlichen Gene in relativer Beziehung zu GAPDH dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei Rezeptoren in den isolierten Ratteninseln exprimiert werden. GPR40 und GPR119 werden in den Inseln viel höher exprimiert als im Darm. Die GPR120-Genexpression ist in den Inseln ähnlich hoch wie im Ileum, wohingegen die GPR120-Expression im Colon vier Mal so hoch ist (Tab. 3-4).

	GPR40	GPR119	GPR120
Ileum	4,6	4,5	21,2
Kolon	3,0	4,1	81,1
Inseln	223,8	1794,4	27,4

Tab. 3-4: Real-Time PCR zum Nachweis von GPR40, GPR119 und GPR120 in Rattendarm und Ratteninseln. Die Expression der Gene in den Geweben wurde in Relation zu GAPDH gesetzt.

In diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass GPR40, GPR119 und GPR120 in den pankreatischen Ratteninseln sowie in den β -Zelllinien Min6c4 und INS-1E exprimiert werden. Analog zu den L-Zellen sollte nun die Lokalisation, die Funktion und die Signaltransduktion von GPR40, GPR119 und GPR120 in den β -Zellen untersucht werden.

3.9 Untersuchung der Lokalisation von Proteinen in Ratten- und Mauspankreas

Entsprechend den Lokalisationsstudien von GLP-1 und GPR40, GPR119 bzw. GPR120 in Ratten- und Maudarm wurde die Colokalisation der Rezeptoren und Insulin in Ratten- und Mauspankreas untersucht. Zunächst wurden Vorversuche zur Lokalisation von Insulin und Glukagon in den pankreatischen Inseln von Ratte und Maus durchgeführt. Die insulinproduzierenden β -Zellen sind im Inneren der Inseln lokalisiert und machen laut Literatur ca. 60-80 % der Inseln aus, die glukagonproduzierenden α -Zellen sind dagegen am Rand der Inseln lokalisiert und haben einen prozentualen Anteil von ca. 20-25 % [95]. In Abbildung 3-39 ist die Lokalisation von Insulin und Glukagon in Ratten- und Mauspankreasschnitten dargestellt. Insulin in rot, und damit die β -Zellen, sind im Inneren der Insel lokalisiert, Glukagon in grün, und damit die α -Zellen, sind in den Randbereichen der Insel lokalisiert (Abb. 3-39 A). In den Mausinseln scheint die Lokalisation der α - und β -Zellen nicht so eindeutig voneinander abgrenzbar zu sein, die glukagonproduzierenden α -Zellen sind in den Mausinseln auch zwischen den β -Zellen im Inneren der Inseln lokalisiert (Abb. 3-39 B).

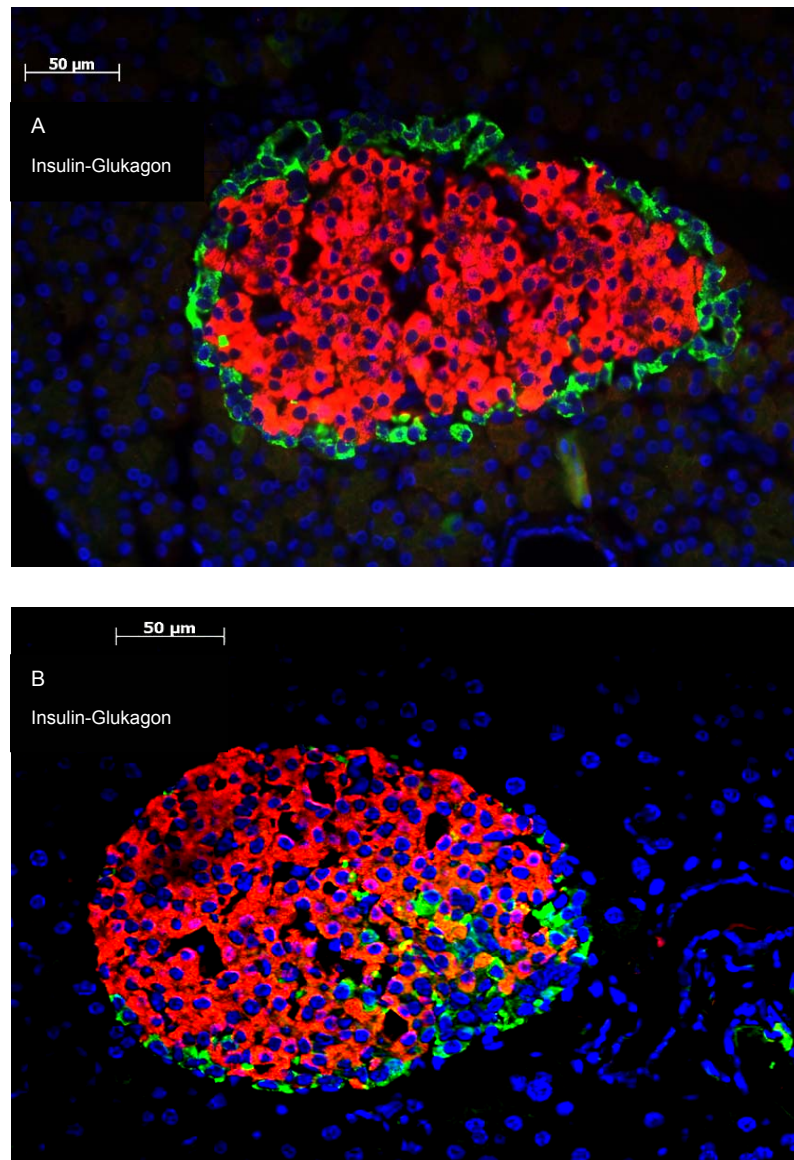


Abb. 3-39 Lokalisation von Insulin und Glukagon im Rattenpankreas (A) und Mauspankreas (B). Die Paraffinschnitte wurden mit einem Meerschweinchen anti-humanen Insulin Antikörper und einem Maus anti-humanen Glukagon Antikörper inkubiert und anschließend mit einem Cy3 (rot) konjugierten und einem Alexa 488 (grün) konjugiertem Sekundärantikörper behandelt. Eine Gegenfärbung des Zellkerns wurde mit DAPI (blau) durchgeführt.

Nach diesen Voruntersuchungen wurde die Lokalisation der insulinproduzierenden β -Zellen und die Expression von GPR40, GPR119 und GPR120 untersucht. Es konnte mit Hilfe des Meerschweinchen anti-humanen Insulin Antikörpers und des Kaninchen anti-Maus GPR119 Antikörpers sowohl in Ratten- wie auch in Mauspankreasschnitten eine Colokalisation von Insulin und GPR119 beobachtet werden (Abb. 3-40 und Abb. 3-41). Als Sekundärantikörper wurde in diesen Versuchen der Cy3 konjugierte anti-Kaninchen Antikörper und ein Alexa 488 konjugierter anti-Meerschweinchen Antikörper gewählt. GPR40 und GPR120

konnten mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörpern nicht detektiert werden.

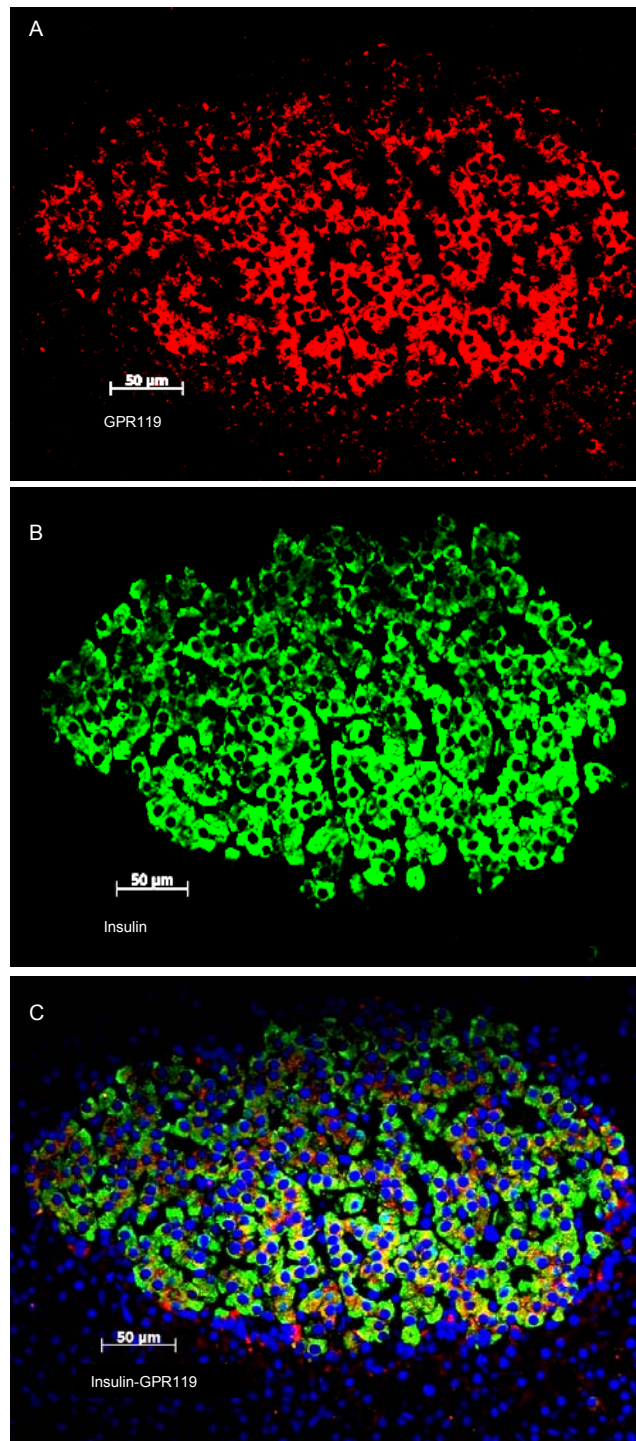


Abb. 3-40 A-C: Lokalisation von Insulin und GPR119 im Rattenpankreas. Die Paraffinschnitte wurden mit einem Meerschweinchen anti-humanen Insulinantikörper und einem Kaninchen anti-Maus GPR119 Antikörper inkubiert und anschließend mit einem Cy3 (rot) konjugierten und Alexa 488 (grün) konjugierten Sekundärantikörper behandelt. Eine Gegenfärbung des Zellkerns wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. A: in rot: Lokalisation von GPR119, B: in grün: Lokalisation von Insulin, C: überlagertes Signal von GPR119 und Insulin, in blau, DAPI.

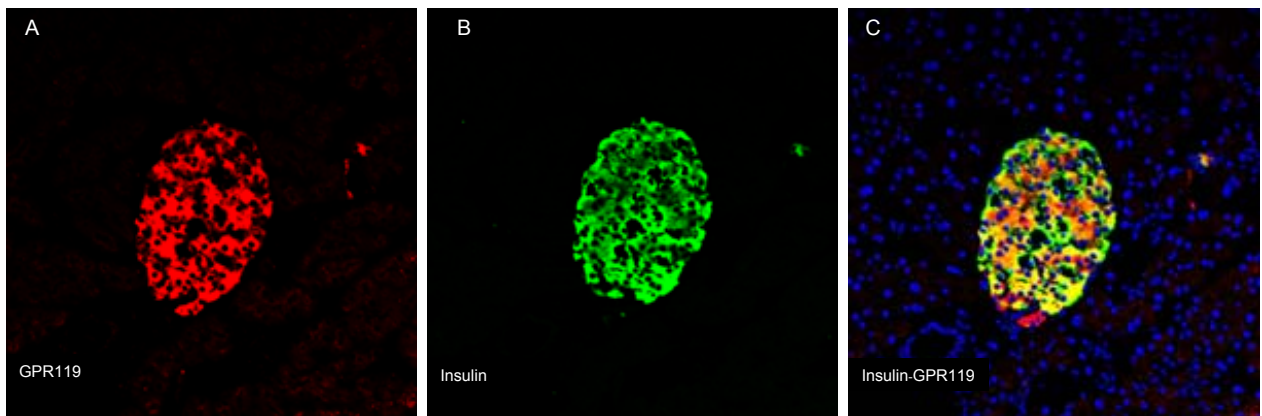


Abb. 3-41 A-C: Lokalisation von Insulin und GPR119 im Mauspankreas. Die Paraffinschnitte wurden mit einem Meerschweinchen anti-humanen Insulinantikörper und einem Kaninchen anti-Maus GPR119 Antikörper inkubiert und anschließend mit einem Cy3 (rot) konjugierten und Alexa 488 (grün) konjugierten Sekundärantikörper behandelt. Eine Gegenfärbung des Zellkerns wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. A: in rot: Lokalisation von GPR119, B: in grün: Lokalisation von Insulin, C: überlagertes Signal von GPR119 und Insulin, in blau, DAPI.

Somit wurde gezeigt, dass die GPR40, GPR119 und GPR120 mRNA in pankreatischen Inseln exprimiert werden und dass das GPR119-Protein und Insulin in den β -Zellen in Mäusen und Ratten colokalisiert sind. Salehi et al. [55] zeigten unter Verwendung eines nicht kommerziell erhältlichen GPR40 Antikörpers, dass GPR40 in Mausinseln mit Insulin colokalisiert ist. Die Lokalisation von GPR120 in pankreatischen Inseln wurde bisher noch nicht untersucht.

In nachfolgenden Versuchen sollte nun überprüft werden, welche funktionelle Bedeutung die drei Rezeptoren und Signaltransduktionen in β -Zellen haben.

3.10 Insulinsekretionsstudien an unterschiedlichen in vitro und ex vivo Modellen

3.10.1 Insulinsekretion aus Min6c4 und INS-1E Zellen

In nachfolgenden Experimenten wurde überprüft, ob GPR40, GPR119 und möglicherweise GPR120 die Insulinsekretion aus den β -Zellen beeinflussen. Die Insulinomazelllinien Min6c4 und INS-1E sind in der Lage, Insulin zu bilden und auszuschütten, deshalb wurden diese beiden Zelllinien eingesetzt, um die Rolle der drei Rezeptoren bei der Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas in vitro zu untersuchen. Es wurde überprüft, ob langkettige ungesättigte Fettsäuren und die

GPR40 und GPR119 Agonisten C40a und C119 die Insulinausschüttung über GPR40, GPR119 und GPR120 in vitro beeinflussen.

Um die Stimulation der Insulinsekretion in INS-1E Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen nach einer Hungerphase von 2,5 h (inkubiert in RPMI1640 ohne Glukose) zunächst mit den Fettsäuren α -Linolensäure (100 $\mu\text{mol/l}$) und Ölsäure (100 $\mu\text{mol/l}$) bei 2,8 mmol/l (niedrig Glukose) und 16,7 mmol/l (hoch Glukose) Glukose inkubiert. Die physiologische Glukosekonzentration beim gesunden Menschen liegt wie in 1.3 dargestellt bei 5 bis 5,5 mmol/l. Bei 2,8 mmol/l (50 mg/dl) ist die glukosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) daher minimal. Als Positivkontrolle wurde in den Versuchen der GLP-1 Rezeptor Agonist Exendin 4 (10 nmol/l) und GLP-1 (10 nmol/l) selbst eingesetzt. In den INS-1E Zellen wurde die Insulinsekretion durch die Zugabe von Glukose stimuliert. Diese glukoseinduzierte Insulinsekretion konnte durch α -Linolensäure, Ölsäure, GLP-1 und Exendin 4 verstärkt werden (Abb. 3-42). GLP-1 und Exendin 4 binden an den GLP-1 Rezeptor und amplifizieren die glukoseinduzierte Insulinsekretion über die Stimulation des G_{α_s} -gekoppelten Signalweg. α -Linolensäure und Ölsäure verstärken die Insulinsekretion dagegen über die Stimulation des G_{α_q} -gekoppelten Signalweges [53].

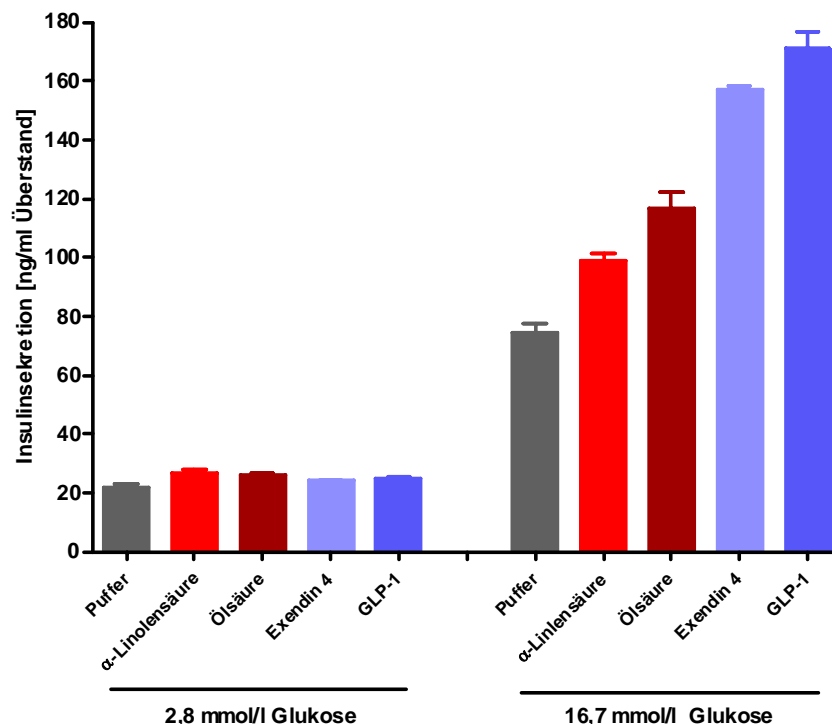


Abb. 3-42: Glukosestimulierte Insulinsekretion in INS-1E Zellen (GSIS). Einfluss von α -Linolensäure und Ölsäure auf die Insulinsekretion in INS-1E Zellen. Die Inkubation erfolgte über 30 min in KRBH. Die Insulinsekretion ist in ng/ml Überstand angegeben. Werte als Mittelwert \pm SEM, n= 4 (repräsentativ für n=4).

In den nachfolgenden Experimenten wurde der Einfluss des GPR40 Agonisten C40a, des GPR119 Agonisten C119 und von α -Linolensäure auf die glukoseabhängige Insulinsekretion in INS-1E Zellen untersucht. Beide Agonisten sowie α -Linolensäure fördern die glukoseabhängige Insulinsekretion glukose- und konzentrationsabhängig (Abb. 3-43 A-C).

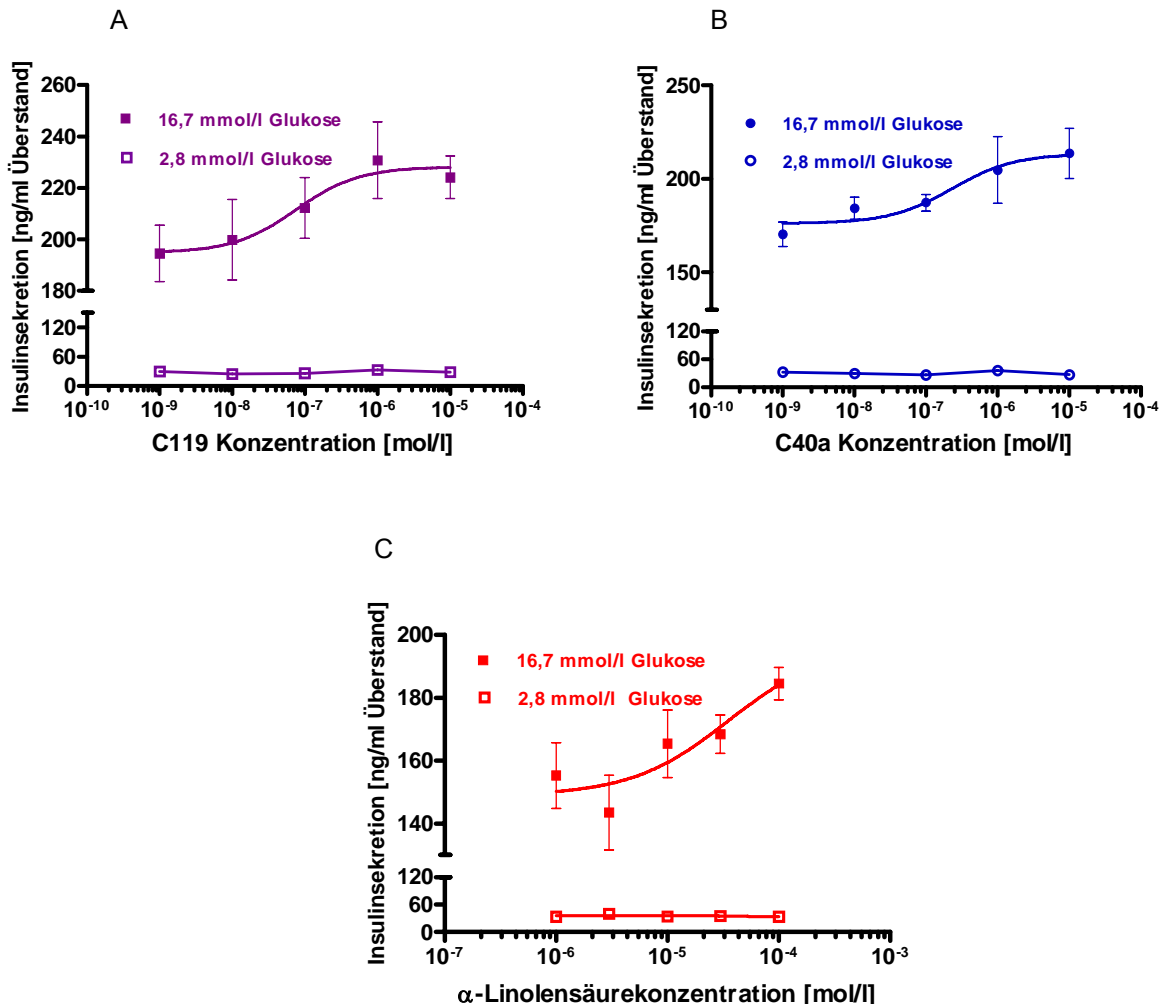


Abb. 3-43: Glukosestimulierte Insulinsekretion in INS-1E Zellen (GSIS). Einfluss des GPR119 Agonisten C119 (A), des GPR40 Agonisten C40 (B) sowie α -Linolensäure (C) auf die Insulinsekretion in INS-1E Zellen. Die Inkubation erfolgte über 30 min in KRBH. Die Insulinsekretion ist in ng/ml Überstand angegeben. Werte als Mittelwert \pm SEM, n= 4. (EC_{50} (C119)= 75,3 nmol/l, EC_{50} (C40a)= 231,4 nmol/l, * EC_{50} (α -Linolensäure)= 3,5 μ mol/l, repräsentativ für n=4).

* EC_{50} : scheinbare EC_{50} Werte

Die Insulinsekretion in INS-1E Zellen wird glukoseabhängig über GPR40 und GPR119 stimuliert. Somit wurden die Ergebnisse von Itho et al. [53] bestätigt, dass selektive und unselektive GPR40 Agonisten die glukoseinduzierte Insulinsekretion über die Aktivierung des $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Signaltransduktionsweges verstärken. Darüber hinaus kann die glukoseinduzierte Insulinsekretion über die Aktivierung des $G_{\alpha s}$ -gekoppelten Signaltransduktionsweges amplifiziert werden.

Anschließend wurde in den Min6c4 Zellen, die neben GPR40 auch GPR120 exprimieren, die Wirkung von α -Linolensäure (100 $\mu\text{mol/l}$), Ölsäure (100 $\mu\text{mol/l}$), C40a (10 $\mu\text{mol/l}$) und C119 (10 $\mu\text{mol/l}$) untersucht. Der GLP-1 Rezeptoragonist Exendin 4 (10 nmol/l) diente als Positivkontrolle. Beide Fettsäuren, C40a und C119 verstärkten die glukoseinduzierte Insulinsekretion in den Zellen (Abb. 3-44).

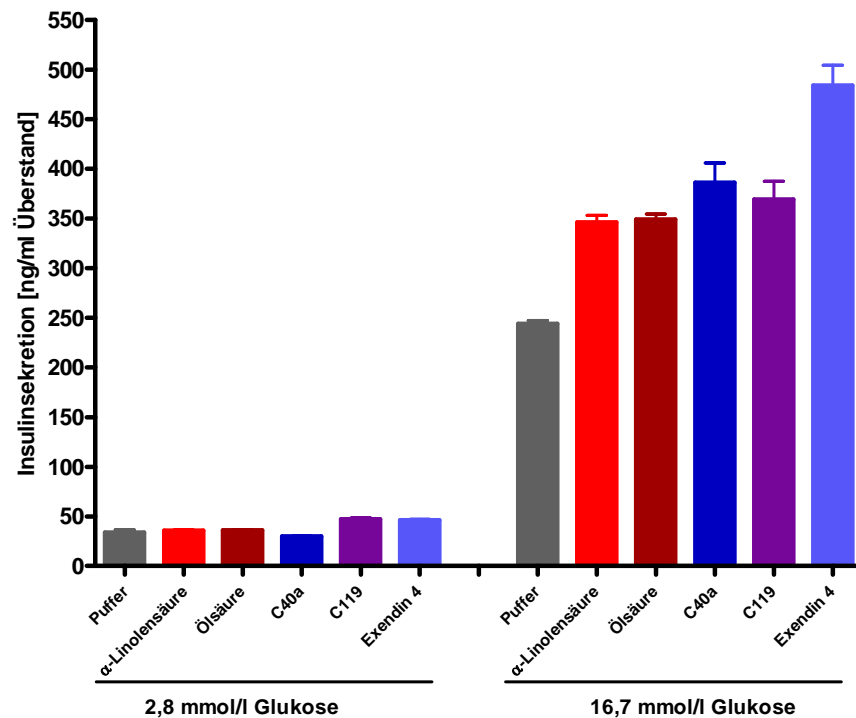


Abb. 3-44: Glukosestimulierte Insulinsekretion in Min6c4 (GSIS). Einfluss von α -Linolensäure, Ölsäure C40a und C119 auf die Insulinsekretion in Min6c4 Zellen. Die Inkubation erfolgte über 30 min in KRBH. Die Insulinsekretion ist in ng/ml Überstand angegeben. Werte als Mittelwert \pm SEM, n= 4 (repräsentativ für n=4).

Über die Rolle von GPR120 bei der fettsäureinduzierten Insulinsekretion aus den Min6c4 Zellen kann keine Aussage gemacht werden.

Die Insulinsekretionsstudien in vitro bestätigten folglich [53, 62], dass die beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren GPR40, GPR119 und möglicherweise GPR120 die glukoseinduzierte Insulinsekretion verstärken.

3.10.2 Insulinsekretion aus isolierten Ratteninseln

Nachdem *in vitro* gezeigt wurde, dass GPR40, GPR119 und möglicherweise auch GPR120 die Insulinausschüttung stimulieren, wurden diese Ergebnisse *ex vivo* verifiziert. Analog zu den *in vitro* Versuchen wurden primäre Ratteninseln ebenfalls mit den Fettsäuren α -Linolensäure und Ölsäure und darüber hinaus mit Docosahexaensäure in KRBH mit 2,8 mmol/l bzw. 16,7 mmol/l Glukose stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die drei Fettsäuren die glukoseinduzierte Insulinsekretion konzentrationsabhängig stimulieren (Abb. 3-45 A-C). Die amplifizierende Wirkung der Fettsäuren auf die glukoseinduzierte Insulinsekretion ist *ex vivo* stärker als *in vitro* (vgl. Abb. 3-43).

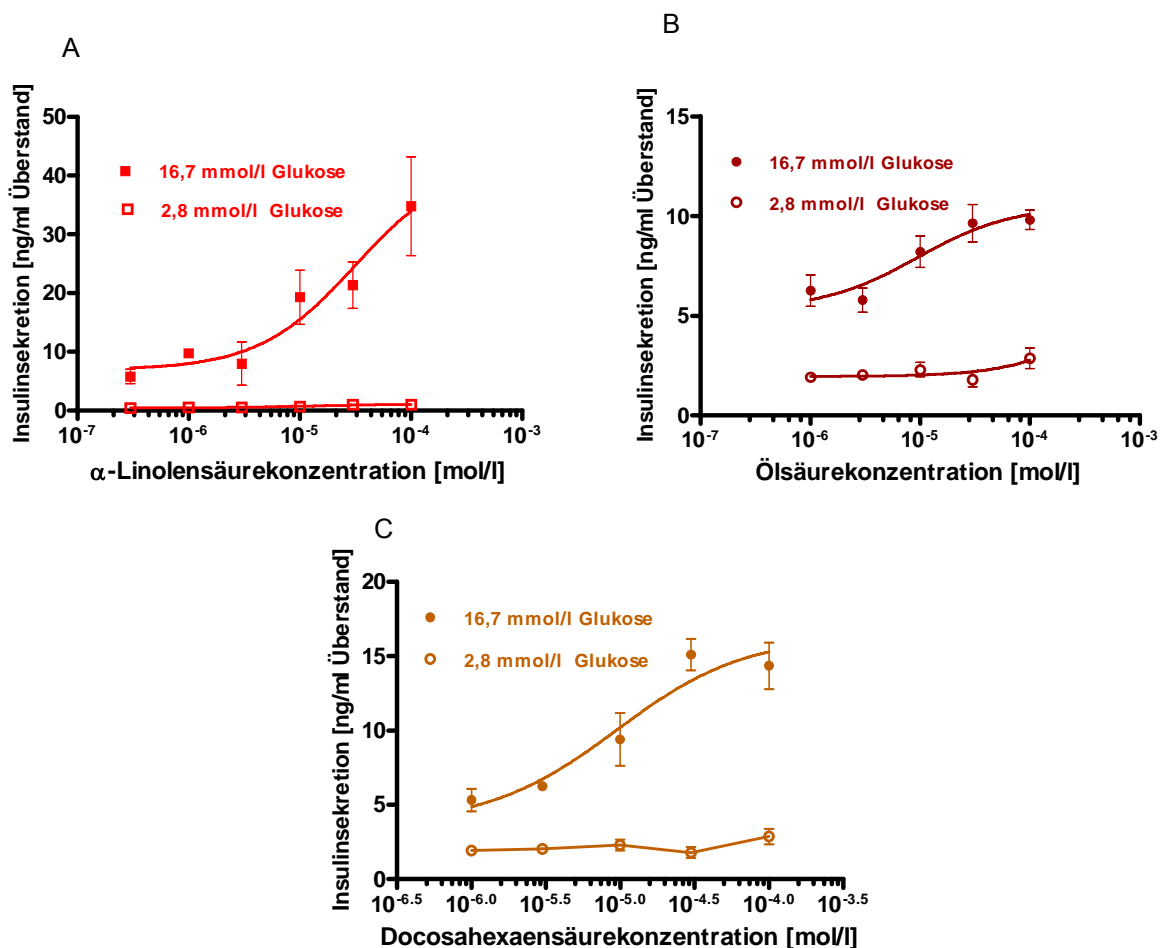


Abb. 3-45: Glukosestimulierte Insulinsekretion in primären Ratteninseln (GSIS). Einfluss von α -Linolensäure (A), Ölsäure (B) und Docosahexaensäure (C) auf die Insulinsekretion in Ratteninseln. Die Inkubation erfolgte über 1 h in KRBH. Die Insulinsekretion ist in ng/ml Überstand angegeben. Werte als Mittelwert \pm SEM, n= 4. (*EC₅₀ (α -Linolensäure)= 3,0 μ mol/l, *EC₅₀ (Docosahexaensäure)= 0,9 μ mol/l, EC₅₀ (Ölsäure)= 1,0 μ mol/l, repräsentativ für n=4).

*EC₅₀: scheinbare EC₅₀ Werte

Anschließend wurde der Einfluss des selektiven GPR40 Agonisten C40a und des selektiven GPR119 Agonisten C119 in primär isolierten Ratteninseln untersucht. Die glukoseinduzierte Insulinsekretion konnte ex vivo sowohl über den $G_{\alpha q}$ -vermittelten wie auch über $G_{\alpha s}$ -vermittelten Signaltransduktionsweg konzentrationsabhängig verstärkt werden (Abb. 3-46 A und B).

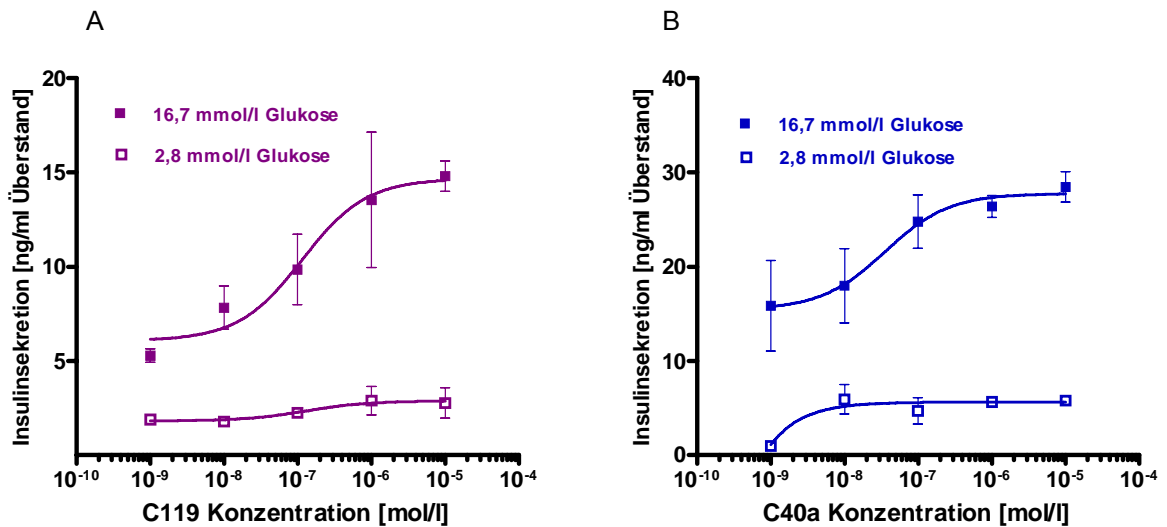


Abb. 3-46: Glukosestimulierte Insulinsekretion in primären Ratteninseln (GSIS). Einfluss von C119 (A) und C40a (B) auf die Insulinsekretion in Ratteninseln. Die Inkubation erfolgte über 1 h in KRBH. Die Insulinsekretion ist in ng/ml Überstand angegeben. Werte als Mittelwert \pm SEM, n= 4. (EC_{50} (C119)= 116 nmol/l, EC_{50} (C40a)= 36 nmol/l, repräsentativ für n=4).

3.11.3 Insulinsekretion aus primären Mausinseln

Primäre Mausinseln wurden von der Schweizer Firma CIOTEX GmbH bezogen. Parallel zu den Untersuchungen in primären Ratteninseln sollte in den Mausinseln die Funktion von GPR40, GPR119 und GPR120 bei der glukoseabhängigen Insulinsekretion untersucht werden. Die Mausinseln wurden mit α -Linolensäure (100 μ mol/l), Forskolin (10 μ mol/l), dem GPR119 Agonisten C119 und mit dem GPR40 Agonisten C40a stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die glukoseinduzierte Insulinsekretion durch C119 und C40a konzentrationsabhängig erhöht werden kann. Außerdem wurde die Insulinsekretion durch 100 μ mol/l α -Linolensäure stimuliert (Abb. 3-47).

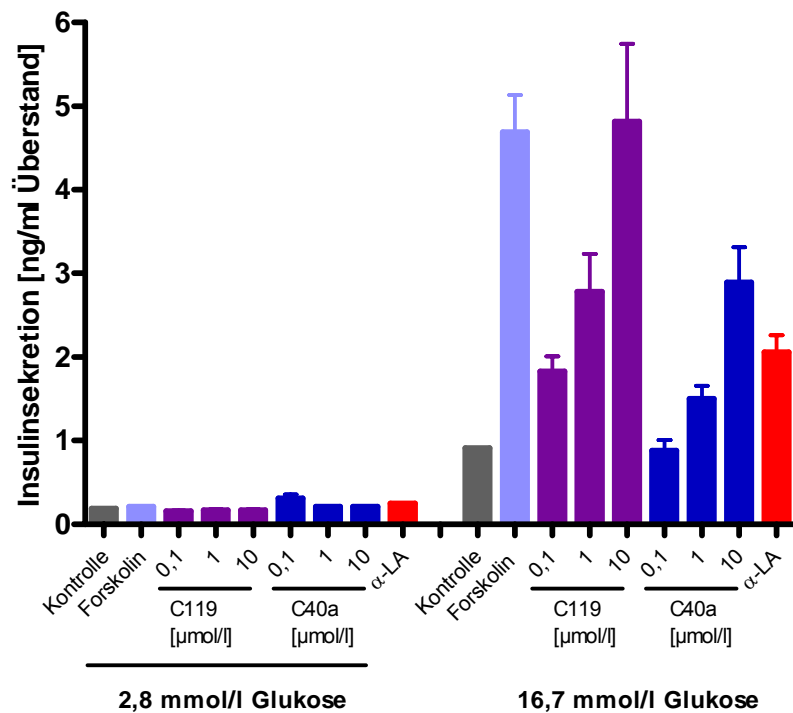


Abb. 3-47: Glukosestimulierte Insulinsekretion in primären Mausinseln (GSIS). Einfluss von α -Linolensäure, Forskolin sowie des GPR40 Agonisten C40a und des GPR119 Agonisten C119 auf die Insulinsekretion in Mausinseln. Die Inkubation erfolgte über 1 h in KRBH. Insulin wurde aus dem Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Insulinsekretion ist in ng/ml Überstand angegeben. Werte als Mittelwert \pm SEM, n= 4 (repräsentativ für n=2). α -LA: α -Linolensäure

Mit Hilfe der in vitro β -Zellmodelle, den INS-1E und den Min6c4 Zellen, sowie der ex vivo β -Zellmodelle, den primären Ratten- und Mausinseln, konnte bestätigt werden [53, 62], dass die glukoseinduzierte Insulinsekretion über unterschiedliche G-Proteine verstärkt werden kann. Sowohl über die G_{α_s} -gekoppelten Rezeptoren GPR119 und den GLP-1 Rezeptor wie auch über den G_{α_q} -gekoppelten Rezeptor GPR40 kann die glukoseinduzierte Insulinsekretion modifiziert werden. Welche Rolle GPR120 bei der fettsäureinduzierten Verstärkung der Insulinsekretion spielt, muss noch geklärt werden. Keine Wirkung hat die Aktivierung der Rezeptoren bei einer Glukosekonzentration von 2,8 mmol/l. Somit wurde bestätigt, dass durch die Aktivierung der G_{α_s} -gekoppelten und G_{α_q} -gekoppelten Signalwege die Insulinsekretion stimuliert wird, eine erhöhte Glukosekonzentration jedoch essentiell ist.

3.11 Apoptose- und Proliferationsuntersuchungen in Min6c4 Zellen

In den STC-1 Zellen wurde gezeigt, dass GPR40 und GPR120 über den $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Signalweg nicht nur die GLP-1 Sekretion stimulieren, sondern auch andere Signalwege aktivieren, so z.B. die Phosphorylierung der Signalmoleküle ERK1/2 und Akt sowie die Proliferation der Zellen. In den folgenden Experimenten wurde deshalb überprüft, ob die drei Rezeptoren auch in den β -Zellen in vitro einen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt haben. In den β -Zellen führt die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt zu einer verstärkten Zellproliferation und zu einer Inhibition der Zellapoptose (vgl. 1.5). Dabei wurde beobachtet, dass der $G_{\alpha s}$ -gekoppelte Signaltransduktionsweg, stimuliert über den GLP-1 Rezeptor, bei der Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt eine wesentliche Rolle spielt [52, 104]. GPR40 stimuliert in β -Zellen in vitro ebenfalls die ERK1/2 Phosphorylierung [153]. Angelehnt an die Experimente mit den STC-1 Zellen, wurde in Min6c4 Zellen untersucht, welchen Einfluss α -Linolensäure, Docosahexaensäure, C40a sowie der GPR119 Agonist C119 auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt haben. Außerdem wurde überprüft, ob α -Linolensäure einer staurosporin- und cytokinininduzierten Apoptose, gemessen an der Aktivierung von Caspase-3, entgegen wirken kann.

3.11.1 Untersuchung der ERK1/2 Phosphorylierung in Min6c4 Zellen

Zunächst wurde überprüft, ob GPR40, GPR119 und GPR120 neben der Insulinsekretion auch die ERK1/2 Phosphorylierung in Min6c4 Zellen beeinflussen. Angelehnt an die Experimente in den STC-1 Zellen wurden die Min6c4 Zellen über 2 Tage ausgesät. 2 h vor Versuchsbeginn wurden diese FKS-frei (mit 0,5 % BSA) kultiviert und anschließend 7,5 min mit α -Linolensäure, Docosahexaensäure und C40a behandelt. Die Western Blot Analyse zeigte, dass α -Linolensäure (100 $\mu\text{mol/l}$), Docosahexaensäure (100 $\mu\text{mol/l}$) und C40a (10 $\mu\text{mol/l}$) die ERK1/2 Phosphorylierung stimulieren, wobei die Fettsäuren die Phosphorylierung stärker stimulierten als C40a (Abb. 3-48).

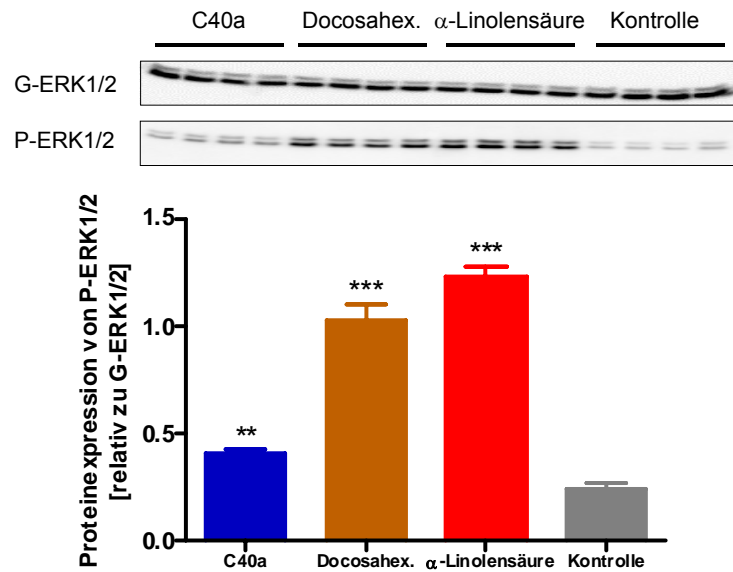


Abb. 3-48: ERK1/2-Phosphorylierung in Min6c4 Zellen. Western Blot Analyse mit den G-ERK1/2 (Gesamt-ERK1/2) und P-ERK1/2 (Phospho-ERK1/2) (42/44 kDa) Antikörpern. Der Abgleich des P-ERK1/2 Antikörpers erfolgte mit G-ERK1/2. Werte als Mittelwerte \pm SEM, n=4. (repräsentativ für n=3). (Docosahex.: Docosahexaensäure), **, p<0,005, *** p<0,001

In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen mit α -Linolensäure (100 μ mol/l), C40a (10 μ mol/l) und C119 (10 μ mol/l) behandelt, um den Einfluss des GPR119 Agonisten zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den STC-1 Zellen, C119 die ERK1/2 Phosphorylierung aktiviert und zwar stärker als α -Linolensäure und C40a (Abb. 3-49).

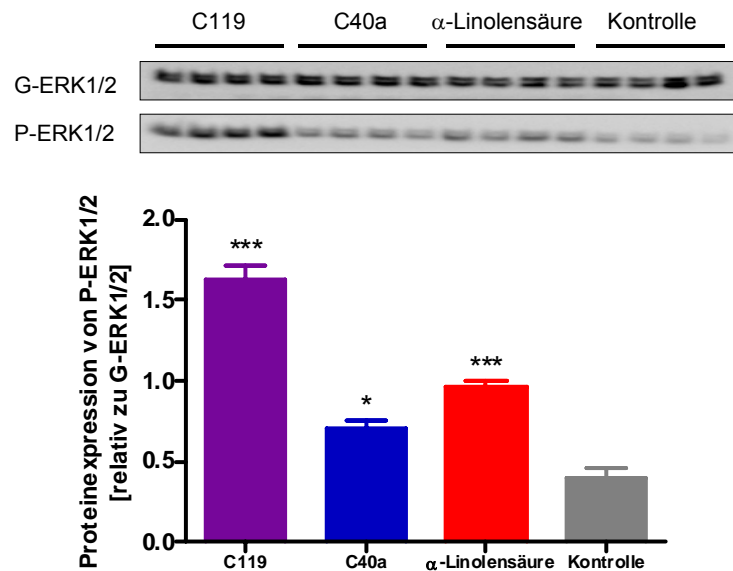


Abb. 3-49: ERK1/2-Phosphorylierung in Min6c4 Zellen. Western Blot Analyse mit den G-ERK1/2 (Gesamt-ERK1/2) und P-ERK1/2 (Phospho-ERK1/2) (42/44 kDa) Antikörpern. Der Abgleich des P-ERK1/2 Antikörpers erfolgte mit G-ERK1/2. Werte als Mittelwerte \pm SEM, n=4. (repräsentativ für n=3) *, p<0,05, *** p<0,001

3.11.2 Untersuchung der Akt Phosphorylierung in Min6c4 Zellen

In einem ähnlichen Ansatz wurde untersucht, ob GPR40, GPR119 und GPR120 bei der Akt Phosphorylierung in Min6c4 Zellen eine Rolle spielen. Dazu wurden die Zellen für 10 min mit α -Linolensäure (100 $\mu\text{mol/l}$), C40a (10 $\mu\text{mol/l}$) und Insulin (10 nmol/l), aber auch mit dem GPR119 Agonisten C119 behandelt und anschließend die Akt-Phosphorylierung mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Stimulierung mit α -Linolensäure, C40a, C119 und Insulin führten zu einer Erhöhung der Akt Phosphorylierung (Abb. 3- 50 A und B).

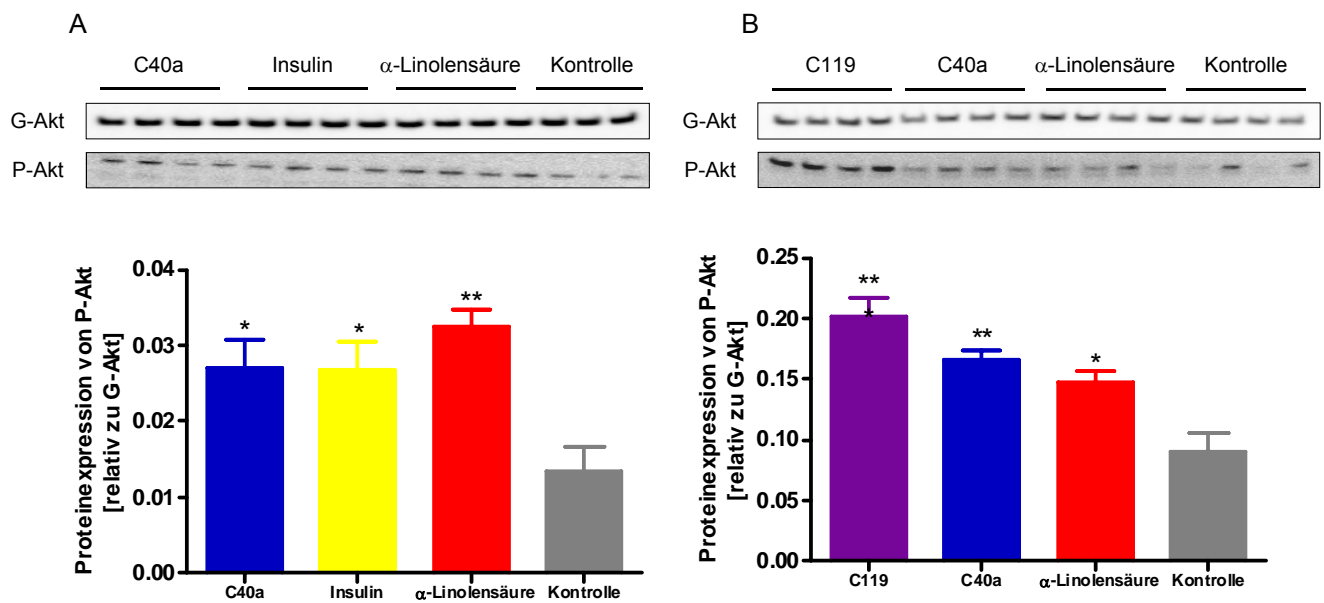


Abb. 3-50 A und B: Akt Phosphorylierung in Min6c4 Zellen. Western Blot Analyse mit den G-Akt (Gesamt-Akt) und P-Akt (Phospho-Akt) (60 kDa) Antikörpern. Der Abgleich des P-Akt Antikörpers erfolgte mit G-Akt. Werte als Mittelwerte \pm SEM, n=4. (repräsentativ für n=3), *, $p < 0,05$, **, $p < 0,005$, *** $p < 0,001$

Zusammenfassend wurde in Min6c4 Zellen bestätigt, dass GPR40, GPR119 und möglicherweise auch GPR120 neben der Insulinsekretion weitere Signalwege aktivieren, so den Ras/ Raf/ MEK/ ERK1/2 sowie den PI3K/ Akt Signalweg. Somit aktiviert GPR119 in den β -Zellen im Gegensatz zu den L-Zellen in vitro die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt. Die Phosphorylierung dieser beiden Signalmoleküle stimuliert in β -Zellen die Zellproliferation [103, 104].

3.11.3 Untersuchung der Apoptose in Min6c4 Zellen durch Messung der Caspase-3 Aktivität

Caspase-3 ist, wie bereits erläutert, ein Apoptosemarker, der während des Apoptosevorganges proteolytisch in zwei Fragmente gespalten wird. In den Min6c4 Zellen wurde analog zu den Experimenten in den STC-1 Zellen untersucht, ob α -Linolensäure einer cytotoxininduzierten Apoptose entgegenwirkt.

Für diese Experimente wurden die Min6c4 Zellen zwei Tage vor Versuch ausgesät. Die Zellen wurden zunächst 2 h FKS-frei (0,5 % BSA) kultiviert und anschließend für 20 h mit Staurosporin (0,1 $\mu\text{mol/l}$) \pm α -Linolensäure (100 $\mu\text{mol/l}$) oder α -Linolensäure (100 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Das kurze aktive Caspase-3 Fragment konnte in den Zellen, die mit Staurosporin behandelt wurden, nachgewiesen werden. Die Zugabe von α -Linolensäure zu den staurosporinbehandelten Zellen führte zu einer deutlichen Senkung der Caspase-3 Aktivität, d.h. α -Linolensäure wirkt in Min6c4 Zellen genauso wie in den STC-1 Zellen anti-apoptotisch (Abb. 3-51).

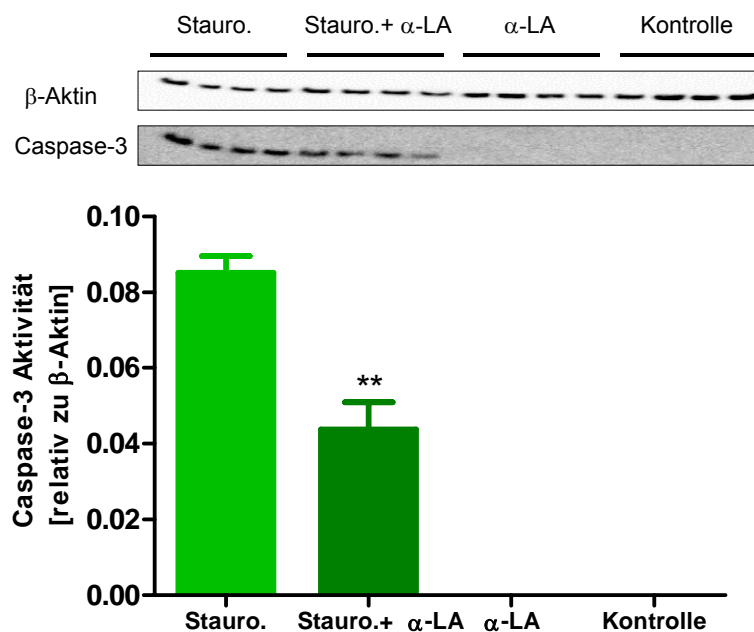


Abb. 3-51: Caspase-3 Aktivierung in Min6c4 Zellen. Western Blot Analyse mit den β -Aktin (43 kDa) und cleaved Caspase-3 (17 kDa) Antikörpern. Der Abgleich des Caspase-3 Antikörpers erfolgte mit dem Aktin-Antikörper. Die Min6c4 Zellen wurden mit α -Linolensäure, mit Staurosporin \pm α -Linolensäure behandelt, danach wurde die Caspase-3 Aktivierung gemessen. Die Behandlung wurde über 20 h durchgeführt. Werte als Mittelwerte \pm SEM, n=4. (repräsentativ für n=3). (α -LA: α -Linolensäure, Stauro.: Staurosporin), **, $p < 0,005$

Die Zellen wurden in einem weiteren Ansatz mit einem Cytokincocktail (2 ng/ml IL-1 β , 10ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ) \pm α -Linolensäure behandelt. Die Caspase-3 Aktivität wurde durch die Cytokine stimuliert. Durch die Zugabe von α -Linolensäure konnte der cytokininduzierten Apoptose entgegengewirkt werden (Abb. 3-52).

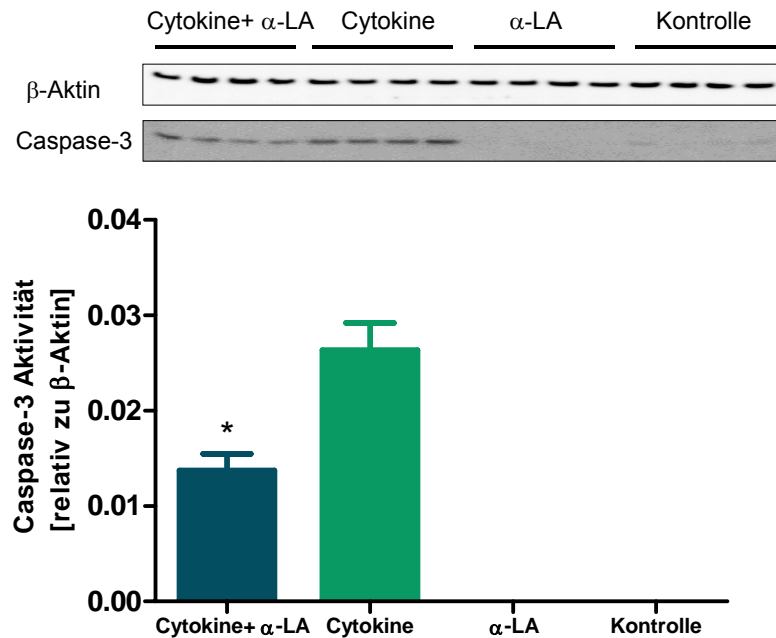


Abb. 3-52: Caspase-3 Aktivierung in Min6c4 Zellen. Western Blot Analyse mit den β -Aktin (43 kDa) und cleaved Caspase-3 (17 kDa) Antikörpern. Der Abgleich des Caspase-3 Antikörpers erfolgte mit dem Aktin-Antikörper. Die Min6c4 Zellen wurden mit α -Linolensäure, mit einem Cytokinmix (2 ng/ml IL-1 β , 10ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IFN- γ) \pm α -Linolensäure behandelt und dann die Caspase-3 Aktivierung gemessen. Die Behandlung wurde über 20 h durchgeführt. Werte als Mittelwerte \pm SEM, n=4. (repräsentativ für n=3). (α -LA: α -Linolensäure), *, p< 0,05

Somit konnte gezeigt werden, dass GPR40 und GPR120 nicht nur in L-Zellen, sondern auch in β -Zellen Signaltransduktionswege induzieren, die einer cytotoxininduzierten Apoptose entgegenwirken.

4 Diskussion

Das Inkretinhormon GLP-1 wird postprandial aus den L-Zellen im Darm ausgeschüttet und hat unterschiedliche Aufgaben im humanen Metabolismus. GLP-1 inhibiert die Magenentleerung, die Magensäuresekretion, die Nahrungsaufnahme sowie die Glukagonsekretion und stimuliert die Insulingenexpression und -sekretion sowie die β -Zellproliferation und -neogenese [5, 15-16]. Die molekularen Mechanismen, die nach Nahrungsaufnahme zur GLP-1 Sekretion aus den L-Zellen führen, sind noch nicht vollständig verstanden. Erste Erkenntnisse über diese Mechanismen zeigen, dass die Regulation der GLP-1 Sekretion aus den L-Zellen im Darm der Regulation der Insulinsekretion aus den β -Zellen im Pankreas teilweise ähnelt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die potentielle Rolle der drei G-Protein gekoppelten Rezeptoren, GPR40, GPR119 und GPR120 bei der GLP-1- und bei der Insulinsekretion sowie bei der Regulation von Proliferation und Apoptose in L- und β -Zellen zu untersuchen.

4.1 Expression und Lokalisation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren im Darm und im Pankreas

Der $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptor GPR40 wird sowohl in den enteroendokrinen Zelllinien STC-1 und NCI-H716 wie auch in den Insulinomazelllinien INS-1E und Min6 exprimiert. Somit war es möglich, die Funktion und Signaltransduktion von GPR40 in L- und β -Zellen in vitro zu untersuchen. GPR40 wird auf RNA-Ebene im Rattenileum, -kolon und in Ratteninseln exprimiert, wobei die quantitative Expressionsanalyse zeigte, dass der Rezeptor in den Inseln weitaus höher exprimiert wird als in den Kolon- und Ileumproben. Dieses Ergebnis überrascht nicht, denn der prozentuale Anteil der L-Zellen im Darm beträgt bei der Ratte ca. 1% aller Zellen, d.h. wird der Rezeptor nur in diesen Zellen exprimiert, so ist auch der Anteil der Rezeptorexpression auf das Gesamtgewebe bezogen, niedrig. Dagegen beträgt der prozentuale Anteil an β -Zellen in den pankreatischen Inseln 60%, d.h. 60% der Zellen in den präparierten Inseln exprimieren GPR40 [53, 55]. Außerdem konnte in einer kürzlich publizierten Arbeit gezeigt werden, dass GPR40 neben den β -Zellen auch in den α -Zellen exprimiert wird [57]. Itho et al. [53] beobachteten, dass GPR40 im Rattenpankreas, -ileum und -kolon exprimiert wird, wobei die Rezeptorexpression im Pankreas ebenfalls deutlich höher war als im Darm, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen.

Wie in Abbildung 3-2 dargestellt ist, wird GPR40 im Rattenileum und –kolon exprimiert, wobei das Expressionsprofil des Rezeptors im Ileum und Kolon auf Proteinebene invers zu dem Profil auf mRNA-Ebene ist. Die Expression des Proteins im Kolon ist höher als im Ileum. Möglicherweise verhält sich der Proteinturnover von GPR40 im Ileum anders als im Kolon. Denn die Konzentration an langkettigen Fettsäuren im Ileum ist höher als im Kolon. Dadurch bindet eine größere Menge dieser an GPR40. Nach der Ligandenbindung wird das Protein internalisiert und abgebaut, wodurch der GPR40-Proteinturnover im Ileum höher ist als im Kolon. Diese Erklärung könnte ein Grund für die niedrigere Proteinmenge im Ileum sein [157].

Bisher gab es noch keine Hinweise zur Lokalisation von GPR40 im Darm. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen zum ersten Mal, dass GPR40 und GLP-1 im Rattenkolon und –ileum colokalisiert sind. Die Immunfluoreszenzfärbung im Rattenkolon bestätigt, dass die L-Zellen, wie in der Literatur beschrieben [7, 11, 12], zwischen den Enterozyten im Darmepithel liegen. Dadurch können die Nährstoffe wie Fettsäuren und Glukose aber auch Substrate wie Gallensäuren und Hormone im Darm luminal an ihre apikalen Rezeptoren binden und die basolaterale GLP-1 Sekretion stimulieren. Durch die Anordnung zwischen den Enterozyten liegen die L-Zellen in der Nähe von Nervenfasern und mikrovaskulären Gefäßen, dadurch kann die GLP-1 Sekretion aus den L-Zellen auch basolateral direkt durch neuronale und hormonelle Signale stimuliert werden [12]. In verschiedenen Arbeiten wurde außerdem gezeigt, dass GPR40 in den β -Zellen des Pankreas lokalisiert ist [55, 58, 118]. In der vorliegenden Arbeit konnte GPR40 im Rahmen der Immunfluoreszenzexperimente in Ratten- und Mausinseln nicht nachgewiesen werden, obwohl die Expression auf mRNA-Ebene eindeutig nachweisbar war. Vermutlich war der, in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper nicht geeignet, um GPR40 in den β -Zellen nachzuweisen. Die extrazellulären Domänen von G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind häufig glykosyliert [119]. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper ist gegen die dritte extrazelluläre Domäne von GPR40 gerichtet. Möglicherweise unterscheidet sich die Glykosylierung von GPR40 im Ratten- und Maudarm zum Ratten- und Mauspankreas in dieser Domäne. Da die Proteinglykosylierung die Proteinfaltung und Proteinstabilität beeinflusst [120, 121] kann eine unterschiedliche Glykosylierung von GPR40 in Darm und Pankreas unter Umständen eine Erklärung dafür sein, dass der Rezeptor im Pankreas immunfluoreszenztechnisch nicht nachweisbar war.

Der $G_{\alpha s}$ -gekoppelte Rezeptor GPR119 wird sowohl in den STC-1 Zellen als auch in den Insulinomazelllinien INS-1E und Min6, nicht aber in den NCI-H716 Zellen exprimiert. Nachweisbar ist die Rezeptor mRNA darüber hinaus im Rattenkolon, -ileum und in Ratteninseln, wobei die quantitative mRNA-Expressionsanalyse zeigte, dass der GPR119-Expressionspegel in den Inseln ebenfalls weitaus höher ist als im Darm. Bonini et al. [60] beobachteten, dass GPR119 beim Menschen hauptsächlich im Pankreas und Gastrointestinaltrakt exprimiert wird, bei Maus und Ratte ist der mRNA GPR119 Expressionspegel im Pankreas, Gastrointestinaltrakt und im Gehirn sehr hoch, wobei auch die quantitative Expressionsanalyse von Bonini et al. zeigte, dass die Rezeptorexpression in allen drei Spezies im Pankreas höher ist als im Darm. Soga et al. [63] bestätigten die GPR119 mRNA Expression im Rattenpankreas, Chu et al. [59] zeigten auf mRNA-Ebene, dass GPR119 im Colon und Dünndarm von Mäusen exprimiert wird und beobachteten die Rezeptorexpression in der enteroendokrinen GLUTag Zelllinie. Auf Proteinebene wurde die GPR119 Expression bisher nicht nachgewiesen. Western Blot Analysen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass GPR119 im Rattenileum und -kolon exprimiert wird und zum ersten Mal wurde nachgewiesen, dass GPR119 mit GLP-1 in L-Zellen colokalisiert ist. Mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik wurde sowohl im Rattenpankreas als auch im Mauspankreas die Proteinexpression von GPR119 in den β -Zellen bestätigt [62]. Ein gegenteiliger Befund wurde dagegen von Sakamoto et al. [122] erhoben. Immunfluoreszenzuntersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass GPR119 in den PP-sekretierenden (pancreatic polypeptide) Zellen exprimiert wird. Es wurden Colokalisationsversuche durchgeführt, in denen Maus- und Rattenpankreasschnitte mit Insulin, Glukagon, Somatostatin und PPY (pancreatic polypeptide Y) spezifische Antikörpern zusammen mit einem GPR119 Antikörper angefärbt wurden. Bei der gemeinsamen Inkubation von Insulin- und GPR119-Antikörpern war in dieser Arbeit keine Colokalisation zu erkennen, was den Daten von Chu et al. [62] und den hier gezeigten Ergebnissen widerspricht.

Der $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptor GPR120 wird in STC-1 und NCI-H716 Zellen sowie in Min6, nicht aber in INS-1E Zellen exprimiert. Hirasawa et al. [58] konnten dagegen in den Zelllinien NCI-H716 und Min6c4 keine GPR120 mRNA detektieren. Im Rattenkolon, -ileum und in Ratteninseln wurde die GPR120 mRNA-Expression quantitativ überprüft, wobei die Rezeptorexpression in Ratteninseln und Ileum ungefähr gleich hoch, dagegen im Kolon vierfach so hoch ist. Hirasawa et al. [58] zeigten ebenfalls, dass GPR120 sowohl im Maus- und im humanen Darm exprimiert wird und dass die mRNA-Expression im Colon höher ist als im Ileum, jedoch wurde

die Rezeptorexpression im Pankreas nicht überprüft. Im Vergleich zu GPR120 war die mRNA-Expression von GPR40 und GPR119 in der vorliegenden Arbeit in den Ratteninseln deutlich höher. Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig die Expression von funktionellem GPR120 im Pankreas gezeigt werden.

Auf Proteinebene konnte die GPR120 Expression im Rattenileum und –kolon nachgewiesen werden und in Lokalisationsuntersuchungen wurde erstmalig nachgewiesen, dass GPR120 in L-Zellen im Rattenileum und –kolon exprimiert wird. Matsuma et al. [123] beobachteten, dass GPR120 im Rattenkolon und in der Rattenzunge lokalisiert ist, jedoch wurde in der Arbeit nicht gezeigt, dass GPR120 im Darm in den L-Zellen exprimiert wird. Eine Lokalisation von GPR120 in Ratten- und Mausinseln war nicht nachweisbar. Die mRNA Rezeptorexpression von GPR120 ist im Vergleich zu GPR40 und GPR119 im Rattenpankreas sehr niedrig, so dass der Rezeptor auf Proteinebene in den Inseln möglicherweise nur sehr schwach exprimiert wird und deshalb immunfluoreszenztechnisch nicht nachweisbar ist. Unter Umständen ist eine unterschiedliche Glykosylierung von GPR120 im Pankreas im Vergleich zum Darm die Ursache dafür, dass das Protein im Pankreas nicht nachweisbar war [120, 121].

	Ileum	Kolon	Langerhans'sche Inseln
mRNA-Expression [relativ zu GAPDH]	4,6	3,0	223,8
Proteinexpression [relativ zu β -Aktin]	1,3	2,4	nicht bestimmt
Lokalisation	L-Zellen	L-Zellen	nicht nachweisbar
mRNA-Expression [relativ zu GAPDH]	4,5	4,1	1794,4
Proteinexpression [relativ zu β -Aktin]	0,7	1,8	nicht bestimmt
Lokalisation	L-Zellen	L-Zellen	β -Zellen
mRNA-Expression [relativ zu GAPDH]	21,2	81,1	27,4
Proteinexpression [relativ zu β -Aktin]	13,2	18,2	nicht bestimmt
Lokalisation	L-Zellen	L-Zellen	nicht nachweisbar

Tab. 4-1: mRNA-Expression, Proteinexpression und Lokalisation von GPR40, GPR119 und GPR120 in Rattenileum, -kolon und Ratten Langerhans'schen Inseln

	STC-1	NCI-H716	Min6c4	INS-1E
GPR40	0,9	0,5	1,3	0,9
GPR119	0,8	nicht nachweisbar	0,4	1,2
GPR120	1,2	0,9	0,2	nicht nachweisbar

Tab. 4-2: mRNA-Expression von GPR40, GPR119 und GPR120 in den enteroendokrinen Zellen STC-1 und NCI-H716 und in den Insulinomazelllinien Min6c4 und INS-1E.

4.2 Charakterisierung der $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptoren GPR40 und GPR120 in transfizierten Zellen

Entsprechend Literaturangaben handelt es sich bei GPR40 und GPR120 um $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptoren [53, 54, 58]. Die G-Proteinkopplung von GPR40 und GPR120 an $G_{\alpha q}$ -Proteine wurde in 1321N1 Zellen, die GPR40 und GPR120 stabil exprimieren, charakterisiert. Dazu wurde die Wirkung von α -Linolensäure, Ölsäure, Docosahexaensäure sowie von GPR40 Agonisten auf die intrazelluläre Kalziummobilisierung in diesen Zellen untersucht. Darüber hinaus wurde die $G_{\alpha q}$ -Kopplung von GPR40 und GPR120 bewertet, indem die intrazelluläre IP_1 Bildung nach Stimulierung mit selektiven und unselektiven Rezeptoragonisten in den genannten Zelllinien und in den STC-1 Zellen gemessen wurde.

Die Stimulierung von 1321N1/hGPR40 und 1321N1/hGPR120 mit α -Linolensäure, Docosahexaensäure und Ölsäure führte zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Bezüglich GPR120 bestätigten diese Daten die Ergebnisse von Hirasawa et al. [58]. In deren Arbeit wurden HEK 293, die GPR120- $G_{\alpha 16}$ stabil exprimierten, mit unterschiedlichen langkettigen ungesättigten Fettsäuren stimuliert und mit Hilfe des FLIPR Assays wurde die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration gemessen. Hirasawa et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass Docosahexaensäure die intrazelluläre Kalziumkonzentration verglichen mit α -Linolensäure bereits bei niedrigeren Konzentrationen erhöhte. In der hier vorliegenden Arbeit war die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, gemessen in den 1321N1/hGPR120 Zellen, durch die Stimulierung mit α -Linolensäure höher als durch die Stimulierung mit Docosahexaensäure. Hirasawa et al. arbeiteten mit dem langen hGPR120 Splicekonstrukt, welches in der Studie aus genomischer DNA generiert wurde. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit die kurze Splicevariante in die 1321N1 Zelllinie transfiziert, da gezeigt wurde, dass in humanem Gewebe (Kolon, Lunge und Pankreas) nur diese kurze Splicevariante exprimiert wird (vgl. 3.5.1). Bei der kurzen Splicevariante wird Exon 3 nicht exprimiert, wobei die Funktionalität von GPR120 durch das Vorhandensein oder das Fehlen dieses Exons nicht beeinträchtigt wird. Jedoch könnte dieser Unterschied Veränderungen bezüglich der Potenz und Effizienz von Liganden nach sich ziehen.

Die EC_{50} -Werte für α -Linolensäure, Docosahexaensäure und Ölsäure in 1321N1/hGPR40 Zellen (EC_{50} (α -Linolensäure)= 4,4 μ mol/l, EC_{50} (Ölsäure)= 6,1 μ mol/l, EC_{50} (Docosahexaensäure)= 6,8 μ mol/l) entsprechen annähernd denen, die

in der Arbeit von Itho et al. (2003) in CHO/hGPR40 Zellen bestimmt wurden (EC_{50} (Linolensäure)= 2,0 $\mu\text{mol/l}$, EC_{50} (Ölsäure)= 2,0 $\mu\text{mol/l}$, EC_{50} (Docosahexaensäure)= 1,1 $\mu\text{mol/l}$). Die GPR40 Agonisten C40a, C40b und C40c erhöhten in 1321N1/hGPR40 Zellen den intrazellulären Kalziumspiegel konzentrationsabhängig, jedoch zeigten sie in 1321N1/hGPR120 Zellen keinen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Somit handelt es sich bei den synthetischen Molekülen um spezifische GPR40 Agonisten, die GPR120 nicht aktivieren. Damit wurde erstmalig entgegen den Daten von Hirasawa et al. [58] gezeigt, dass die GLP-1 Sekretion durch GPR40 stimuliert werden kann (vgl. 4.2.1). Bisher gibt es keine weiteren Daten, die belegen, dass nur GPR120 und nicht GPR40 für die fettsäureinduzierte GLP-1 Sekretion verantwortlich ist.

Mit Hilfe der stabil transfizierten GPR40- und GPR120-Zelllinien wurde somit bestätigt, dass selektive und unselektive GPR40 und GPR120 Agonisten den G_{α_q} -gekoppelten Signaltransduktionsmechanismus aktivieren, d.h. die GLP-1 Sekretion, stimuliert durch Fettsäuren und die selektiven GPR40 Agonisten wird über den G_{α_q} -gekoppelten Signaltransduktionsweg vermittelt. In weiterführenden Experimenten wurde gezeigt, dass langkettige, ungesättigte Fettsäuren auch in STC-1 Zellen, die GPR40 und GPR120 endogen exprimieren, den G_{α_q} -gekoppelten Signaltransduktionsweg aktivieren. α -Linolensäure und Ölsäure sowie C40a und C40b stimulierten in den Zellen die IP_1 Bildung konzentrationsabhängig. Dieses Ergebnis bestätigt, dass es sich bei den Fettsäurerezeptoren um G_{α_q} -gekoppelte Rezeptoren handelt, d.h. eine Ligandenbindung an die Rezeptoren führt zur Aktivierung von G-Proteinen der G_{α_q} -Unterfamilie. Infolge dessen werden IP_3 und DAG generiert. IP_3 aktiviert die Mobilisierung von intrazellulären Kalziumspeichern, was zu einer erhöhten Kalziumkonzentration im Cytoplasma führt (vgl. 1.2.5). Diese erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration ist für den Exozytosevorgang der GLP-1 Granula notwendig, denn für die Fusion der Vesikelmembran mit der Plasmamembran über die SNARE (synaptosome-associated protein receptor) Proteine ist ein erhöhter Anteil an intrazellulärem Kalzium essentiell [130].

4.3 Sekretion von GLP-1 in vitro und ex vivo

4.3.1 GLP-1 Sekretionsstudien an der STC-1 Zelllinie

Zunächst wurde in vitro die potentielle Rolle von GPR40, GPR119 und GPR120 bei der GLP-1 Sekretion untersucht. GPR40 ist ein G_{α_q} -gekoppelter Rezeptor und wird hauptsächlich im Pankreas, aber auch im Darm exprimiert und stimuliert die Insulinsekretion aus den β -Zellen im Pankreas [53, 55, 63]. In unterschiedlichen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass ungesättigte und gesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von mehr als 10 Kohlenstoffatomen an GPR40 binden und den Rezeptor aktivieren [53, 54, 124]. GPR120 ist ebenfalls ein G_{α_q} -gekoppelter Rezeptor, der durch eine Reihe von langkettigen Fettsäuren aktiviert werden kann. Die Bindung derer führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration [58, 64] und stimuliert in vitro die GLP-1 Sekretion [58]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die langkettigen ungesättigten Fettsäuren Ölsäure, α -Linolensäure und Docosahexaensäure die GLP-1 Sekretion aus den STC-1 Zellen konzentrationsabhängig stimulieren. Keine Wirkung zeigte jedoch die langkettige gesättigte Fettsäure Palmitinsäure. Durch die Stimulierung mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren α -Linolensäure und Docosahexaensäure konnte eine höhere Sekretionsrate beobachtet werden als durch die Stimulierung mit Ölsäure. Diese Daten bestätigen zum Teil die Ergebnisse einer Studie, in der gezeigt wurde, dass α -Linolensäure und Docosahexaensäure nicht aber Ölsäure die GLP-1 Sekretion stimulieren [58], wobei gesättigte Fettsäuren wie Stearinsäure ebenfalls keinen Einfluss auf die GLP-1 Sekretion hatten. In der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich, durch Stimulation mit Fettsäuren ein GLP-1 Sekretionsplateau zu erreichen. Bis zu einer Fettsäurekonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ stieg die GLP-1 Ausschüttung kontinuierlich an. Höhere Konzentrationen waren für die Zellen jedoch toxisch.

Der selektive GPR40 Agonist C40a stimulierte die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen konzentrationsabhängig, jedoch war die Effizienz im Vergleich zu den Fettsäuren niedriger. Somit scheint C40a nur ein partieller GPR40 Agonist zu sein, es sei denn die höhere Effizienz der Fettsäuren ist auf die Bindung an GPR120 und auf die daraus resultierende GLP-1 Sekretion zurückzuführen. Die Selektivität von C40a bezüglich GPR40 wurde mit Hilfe der Kontrollzelllinie 1321N1/hGPR120 im FLIPR Assay nachgewiesen (vgl. 4.2). Der Agonist hatte in diesen Zellen keinen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration, interagiert also nicht mit GPR120.

Hirasawa et al. [58] zeigten in ihrer Arbeit, dass GPR120 nicht aber GPR40 für die GLP-1 Sekretion aus STC-1 Zellen verantwortlich ist. STC-1 Zellen wurden mit GPR120 und GPR40 spezifischer siRNA transfiziert und mit α -Linolensäure stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die GLP-1 Sekretion, ausgelöst durch α -Linolensäure, im Vergleich zu den nichttransfizierten Zellen, nur in den Zellen herabgesetzt war, die mit der GPR120 spezifischen siRNA transfiziert wurden. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass GPR120, nicht aber GPR40, an der fettsäureinduzierten GLP-1 Sekretion aus den STC-1 Zellen beteiligt ist. Der Knockdown der beiden Gene nach der Transfektion mit den spezifischen siRNAs betrug bei GPR120 allerdings nur rund 30%, bei GPR40 rund 25%. Deshalb war der Knockdown von GPR40 möglicherweise zu schwach, um eine signifikante Erniedrigung der fettsäureinduzierten GLP-1 Sekretion in den transfizierten Zellen zu beobachten. In GLUTag Zellen wurde gezeigt, dass die fettsäureinduzierte GLP-1 Sekretion GPR40 und GPR120 unabhängig ist [125], was darauf hindeutet, dass die Mechanismen, die zur GLP-1 Sekretion führen, vom jeweiligen Zelltyp abhängig sind.

Erstmalig wurde beobachtet, dass die C40a induzierte GLP-1 Sekretion durch 30 $\mu\text{mol/l}$ α -Linolensäure additiv erhöht werden konnte, was für eine Koaktivität von GPR40 und GPR120 spricht. Somit ist es eventuell möglich, die nährstoffinduzierte GLP-1 Sekretion durch die parallele Applikation eines synthetischen GPR40 oder GPR120 Agonisten in vivo zu erhöhen. Bei einer α -Linolensäurekonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ konnte die C40a induzierte GLP-1 Sekretion nicht weiter erhöht werden. Vermutlich ist bei dieser hohen α -Linolensäurekonzentration bereits eine maximale GLP-1 Sekretion erreicht, denn die GLP-1 Freisetzung, ausgelöst durch 100 $\mu\text{mol/l}$ α -Linolensäure allein war genauso hoch wie die Sekretion, ausgelöst durch C40a kombiniert mit 100 $\mu\text{mol/l}$ α -Linolensäure. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine additive Erhöhung der nährstoffinduzierten GLP-1 Sekretion durch synthetische Agonisten von der Nahrungszusammensetzung bzw. den darin enthaltenen Fetten und der Fettsäureverteilung abhängig ist. Die Frage, wie hoch die Konzentration von Fettsäuren im Ileum bzw. im Kolon postprandial wirklich ist bzw. wie hoch die lokale Fettsäurekonzentration an den Rezeptoren ist, ist schwierig zu beantworten, weil dies sehr stark von der aufgenommenen Nahrung abhängt. Es gibt einige Angaben zum Gehalt der Gesamtfettsäuren postprandial [126, 127]. Der freie Fettsäuregehalt schwankt danach abhängig von der aufgenommenen Mahlzeit zwischen 20 und 60 mmol/l . Es wird davon ausgegangen, dass von diesen freien Fettsäuren ungefähr 5-7 % das Ileum und den Kolon erreichen. Die Konzentration der freien Fettsäuren

würde demnach zwischen 1- 4 mmol/l liegen. Allerdings ist die Zusammensetzung der freien Fettsäuren, d.h. der Anteil der langkettigen ungesättigten Fettsäuren, sehr stark von der Nahrungszusammensetzung abhängig. Außerdem muss zusätzlich beachtet werden, dass die freien Fettsäuren in Mizellen im Chymus eingeschlossen sind und daher ist es schwierig, die Frage zu beantworten, welche Mengen an freien Fettsäuren direkt an die Rezeptoren binden können. Aufgrund dessen bleibt die Frage spannend, ob durch die postprandiale Gabe eines GPR40 oder GPR120 Agonisten evtl. eine Erhöhung der GLP-1 Ausschüttung möglich ist und wie sich eine zusätzliche Gabe eines synthetischen Agonisten postprandial in vivo verhält. Dazu sind in vivo Experimente sowie Probandenstudien notwendig.

In den Colokalisationsexperimenten konnte erstmalig gezeigt werden, dass GPR119 in Rattenkolon L-Zellen exprimiert wird (vgl. Abb. 3-3). Bonini et al. [60] zeigten, dass GPR119 hauptsächlich im Pankreas aber auch im Darm exprimiert wird, jedoch wurde die exakte Lokalisation von GPR119 im Darm nicht bestimmt. Im Pankreas moduliert GPR119 die glukoseinduzierte Insulinsekretion aus den β -Zellen [62,63]. Außerdem konnten Overton et al. [77] beobachten, dass Oleylethanolamid (OEA), ein endogener GPR119 Ligand, die Nahrungsaufnahme unterdrückt und zu einer Reduktion des Körpergewichts in Ratten führte, aber die Mechanismen, die diese Effekte auslösen, sind noch unbekannt. Chu et al. [59] zeigten, dass GPR119 Agonisten die GLP-1 Sekretion aus den GLUTag Zellen stimulieren und dass diese Agonisten, wenn sie Nagern verabreicht werden, den Plasma GLP-1 Spiegel akut erhöhen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der endogene GPR119 Ligand Oleylethanolamid sowie der selektive GPR119 Agonist C119 die GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen konzentrationsabhängig stimulieren, d.h. die GPR119 induzierte GLP-1 Sekretion könnte für die Effekte, die Overton et al. beobachteten, verantwortlich sein. Die Potenz des GPR40 Agonisten C40a und des GPR119 Agonisten C119 bei der Stimulierung der GLP-1 Sekretion in STC-1 Zellen war ähnlich hoch, jedoch stimulierte C40a die Sekretion effizienter als C119. Somit wird die GLP-1 Sekretion durch eine Ligandenbindung an $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptoren vermutlich effizienter stimuliert als durch $G_{\alpha s}$ -gekoppelte Rezeptoragonisten. Diese Hypothese wird dadurch bekräftigt, dass in STC-1 Zellen durch den Proteinkinase C Aktivator PMA die GLP-1 Sekretion zweifach so hoch stimuliert wurde wie durch den Adenylatzyklaseaktivator Forskolin.

GPR119 ist ein $G_{\alpha s}$ -gekoppelter Rezeptor, d.h. eine Stimulierung führt zu einer erhöhten intrazellulären cAMP Konzentration (vgl. 1.2.3) und in der vorliegenden

Arbeit wurde bestätigt, dass durch Forskolin die GLP-1 Sekretion in vitro erhöht werden kann [52]. Furmann et al. [129] diskutieren in ihrem Review über die Rolle von cAMP bei der Vermittlung der nährstoffinduzierten GLP-1 Sekretion. Chu et al. [62] konnten in GLUTag Zellen zeigen, dass GPR119 Agonisten die intrazelluläre cAMP Konzentration erhöhen. Aufgrund dessen, dass cAMP in der β - Zelle ein wichtiger physiologischer Modulator der glukoseinduzierten Insulinsekretion ist [129], wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle von GPR119 bei der GLP-1 Sekretion näher charakterisiert, in der Annahme, dass GPR119 auch in der L- Zelle als Modulator der Hormonausschüttung wirkt.

C40a ist ein partieller GPR40 Agonist, aber die Costimulierung der STC-1 Zellen mit C40a und 10 $\mu\text{mol/l}$ C119 führte zu einer Sekretionseffizienz, vergleichbar mit der von Fettsäuren. Somit wurde erstmalig gezeigt, dass eine erhöhte intrazelluläre cAMP Konzentration den IP_3/DAG induzierten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration amplifiziert, wodurch die GLP-1 Sekretion mit der gleichen Effizienz wie mit Fettsäureagonisten stimuliert werden kann. Rezeptorunabhängig wurde diese Theorie bestätigt, indem STC-1 Zellen mit PMA alleine und zusammen mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin stimuliert wurden und Forskolin die PMA-induzierte GLP-1 Sekretion erhöhte. Somit verstärkt GPR119 die $G_{\alpha q}$ -induzierte GLP-1 Sekretion in L- Zellen und wirkt, wie auch in den β -Zellen, als Modulator der Hormonsekretion.

Die Stimulation der STC-1 Zellen mit Glukose führte konzentrationsabhängig zu einem Anstieg der GLP-1 Sekretion. Mit Hilfe der GLUTag Zelllinie konnte bereits gezeigt werden, dass Glukose die GLP-1 Sekretion stimuliert [45, 46]. Glukose wird über SGLT1 in die L-Zellen transportiert, verstoffwechselt und stimuliert auf diesem Weg wie in 1.2.3. beschrieben die GLP-1 Sekretion. Allerdings wurde lange Zeit diskutiert, ob Glukose postprandial als direkter Stimulus in der L-Zelle überhaupt eine Rolle spielt [11], denn der größte Anteil der über die Nahrung aufgenommene Glukose wird bereits im Duodenum absorbiert. Es kommen also höchstens noch minimale Mengen im Ileum oder Kolon an und es ist fraglich, ob diese geringen Mengen einen Einfluss auf die Hormonsekretion haben. Es wurde vielmehr postuliert, dass Glukose im Duodenum die GIP Sekretion stimuliert und dass GIP vagal oder direkt die GLP-1 Sekretion in den distalen Darmabschnitten stimuliert [11]. In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass eine gewisse Menge an L-Zellen auch im Duodenum exprimiert werden. Geschmacksrezeptoren, die in den L-Zellen exprimiert werden, können durch Glukose stimuliert werden und aktivieren daraufhin die GLP-1 Sekretion aus diesen Zellen [14].

4.3.2 GLP-1 Sekretionsstudien am ex vivo Rattenkolonmodell

Zur weiteren Charakterisierung der GLP-1 Sekretion aus L- Zellen wurde in dieser Arbeit ein ex vivo Rattenkolonmodell etabliert. Rattenkolonstücke wurden hierbei mit den Fettsäuren α -Linolensäure, Ölsäure und Docosahexaensäure stimuliert und GLP-1 im Überstand bestimmt. Alle drei langkettigen Fettsäuren führten entsprechend dem in vitro Modell zu einer konzentrationsabhängigen GLP-1 Sekretion aus den stimulierten Kolonabschnitten. Ölsäure stimulierte die Hormonsekretion im ex vivo Modell stärker als α -Linolensäure und Docosahexaensäure, wohingegen in vitro α -Linolensäure und Docosahexaensäure bei sehr hohen Fettsäurekonzentrationen einen stärkeren stimulierenden Einfluss zeigten. Vermutlich sind die Unterschiede hinsichtlich der Stimulation der GLP-1 Sekretion durch die unterschiedlichen Fettsäuren speziebeding.

In Mäusen führte die direkte Gabe von α -Linolensäure in den Kolon in der Pfortader zu einer erhöhten GLP-1 Plasmakonzentration [42]. Eine Applikation der Fettsäure direkt ins Ileum und ins Duodenum hatte keine Erhöhung der Plasma GLP-1 Sekretion zur Folge. Die mittelkettige gesättigte Fettsäure Oktansäure zeigte in dieser Studie keine Wirkung, somit wurde bestätigt, dass nur langkettige ungesättigte Fettsäuren die GLP-1 Sekretion stimulieren und dass Fettsäuren die GLP-1 Sekretion bei Mäusen nur im Kolon aktivieren. Die Stimulierung der Rattenkolonstücke mit den GPR40 Agonisten C40a, C40b und C40c erhöhte die GLP-1 Sekretion konzentrationsabhängig, wobei alle drei Agonisten die GLP-1 Sekretion ebenfalls nur partiell stimulierten. Entsprechend den in vitro generierten Ergebnissen, wurde somit bestätigt, dass GPR40 an der GLP-1 Sekretion, postprandial ausgelöst durch langkettige ungesättigte Fettsäuren, mitbeteiligt ist.

Ex vivo wurde außerdem erstmalig gezeigt, dass 30 $\mu\text{mol/l}$ α -Linolensäure die C40a induzierte GLP-1 Sekretion additiv erhöht. Folglich sprechen nicht nur die in vitro Ergebnisse, sondern auch die ex vivo Daten dafür, dass postprandial die nährstoffinduzierte GLP-1 Sekretion vermutlich durch einen synthetischen Agonisten erhöht werden kann. Allein oder in Kombination mit einem DPP IV Inhibitor könnte dadurch postprandial die GLP-1 stimulierte Insulinsekretion in pankreatischen β -Zellen erhöht werden. Dieser Ansatz würde eine neue, vielversprechende Strategie für die Behandlung bei Typ 2 Diabetes ermöglichen.

Ex vivo wurde außerdem bestätigt, dass GPR119 die GLP-1 Sekretion im Rattenkolon stimuliert. OEA und der GPR119 Agonist C119 führte zu einer konzentrationsabhängigen GLP-1 Sekretion, wobei C119 im ex vivo Modell potenter

wirkte ($EC_{50} = 94 \text{ nM}$) als im *in vitro* System ($EC_{50} = 730 \text{ nM}$). Vermutlich ist die höhere Potenz von C119 *ex vivo* auf den Speziesunterschied zwischen *in vitro* und *ex vivo* System zurückzuführen. Dass cAMP *ex vivo* ebenfalls amplifizierend auf die IP_3 / DAG induzierte GLP-1 Sekretion wirkt, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig rezeptorunabhängig durch die Stimulierung der Rattenkolonstücke mit PMA und Forskolin gezeigt. Forskolin stimulierte die PMA-induzierte GLP-1 Sekretion additiv. Entsprechend den *in vitro* Ergebnissen wurde auch *ex vivo* nachgewiesen, dass GPR119 die GPR40 induzierte GLP-1 Sekretion amplifiziert. Somit wurde *ex vivo* bestätigt, dass GPR119 in der L-Zelle, wie auch in den β -Zellen amplifizierend auf die Hormonsekretion wirkt.

Nicht nur Fettsäuren, sondern auch Glukose stimulierte konzentrationsabhängig die GLP-1 Sekretion *ex vivo*. Allerdings bleibt wie bereits in 4.2.1 umstritten, ob die Glukose induzierte GLP-1 Sekretion im Kolon physiologisch, d.h. postprandial eine Rolle spielt, da fraglich ist, ob die Glukosemenge, welche die unteren Darmabschnitte erreicht, überhaupt ausreicht, um die GLP-1 Ausschüttung zu stimulieren [11].

4.4 Sekretion von Insulin *in vitro* und *ex vivo*

4.4.1 Insulinsekretionsstudien mit den INS-1E und Min6 Zelllinien

Die Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas wird hauptsächlich durch Glukose stimuliert. Die glukoseinduzierte Insulinausschüttung wird zusätzlich durch verschiedene physiologische Modulatoren amplifiziert (vgl. 1.3). Diese erhöhen die glukoseinduzierte Insulinsekretion u.a. über $G_{\alpha q}$ - und $G_{\alpha s}$ -gekoppelte Rezeptoren [53, 86, 129, 131]. Langkettige ungesättigte Fettsäuren stimulieren die glukoseinduzierte Insulinsekretion aus den β -Zellen im Pankreas [53, 55, 132]. Es wurde gezeigt, dass Fettsäuren die Insulinsekretion über unterschiedliche Wege stimulieren [133, 134]. Fettsäuren werden zum einen metabolisiert, dabei ist das AMP-activated protein kinase (AMPK)/ Malonyl-CoA/ long-chain Acyl-CoA (LC-CoA) Signalnetzwerk involviert. Dadurch wird die β -Oxidation inhibiert und die Veresterung des angereicherten LC-CoA stimuliert über verschiedene Prozesse die Insulinsekretion [133-136]. Die Identifizierung von GPR40 als Fettsäurerezeptor, welcher in den β - Zellen des Pankreas exprimiert wird, führte zum anderen zu einer Reihe von Untersuchungen, die zeigten, dass GPR40 bei der fettsäureinduzierten Insulinsekretion eine wesentliche Rolle spielt [53, 54, 55, 63]. Immunhistochemisch

konnte nachgewiesen werden, dass GPR40 in den β - Zellen des Pankreas lokalisiert ist [55, 58]. Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 12 bis 18 Kohlenstoffatomen binden an GPR40 [53] und stimulieren über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration die glukoseinduzierte Insulinsekretion. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass GPR40 eine wichtige, wenn nicht essentielle Rolle bei der fettsäureinduzierten GLP-1 Sekretion spielt [53, 55, 63, 137, 138]. Min6 Zellen wurden mit GPR40 spezifischer siRNA transfiziert und mit α -Linolensäure stimuliert. In den transfizierten Zellen, verglichen mit den nicht transfizierten Zellen, konnte keine α -linolensäureabhängige Insulinsekretion beobachtet werden [53]. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass GPR40 für die fettsäureinduzierte Insulinsekretion essentiell ist. In vivo konnte gezeigt werden, dass in GPR40 knockout Mäusen die fettsäureinduzierte Insulinsekretion nur halb so hoch war wie in Wildtypen [137].

Während eine akute Behandlung mit freien Fettsäuren die Insulinsekretion stimuliert [53, 55, 137, 139], führt eine chronische Belastung der β -Zellen mit Fettsäuren zu einer Störung der Insulinsekretion [55, 140-143]. Steneberg et al. [143] zeigten, dass die transgene Überexpression von GPR40 in β -Zellen von Mäusen zu einer gestörten β -Zellfunktion, Hypoinsulinämie und zu einem diabetischen Phänotyp führt. Es wird diskutiert, dass eine chronische Belastung mit Fettsäuren eine langanhaltende Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration erzeugt, die für die Zellen toxisch ist und folglich zu einer β -Zelldysfunktion führt [144]. Latour et al. [137] zeigten dagegen in ihrer kürzlich publizierten Arbeit in GPR40 knockout Mäusen, dass diese Tiere nicht vor einer chronischen fettsäureinduzierten Störung der Insulinsekretion geschützt sind. Diese Daten weisen darauf hin, dass GPR40 bei den fettsäureinduzierten, schädlichen Effekten auf die Insulinsekretion keine Rolle spielt. Diese kontroversen Ergebnisse zeigen, dass weitere Untersuchungen notwendig sind, um die Mechanismen zu verstehen, die chronisch für den schädlichen Einfluss von Fettsäuren auf die Insulinsekretion und auf die β -Zellfunktion verantwortlich sind. Die anhaltenden Bestrebungen, synthetische Agonisten und Antagonisten für GPR40 zu entwickeln, werden helfen, die Relevanz dieses Rezeptors bei der Glukosehomöostase aufzuklären.

In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass GPR40 auch in den glukagonproduzierenden α -Zellen exprimiert wird und dass α -Linolensäure die Glukagonsekretion in der Hamster Glukagonoma Zelllinie In-R1-G9 stimuliert. Isolierte Mäuseinseln zeigten nach α -Linolensäurestimulation ebenfalls eine Glukagonsekretion und mit Hilfe von antisense Experimenten konnte gezeigt

werden, dass diese Antwort von der Aktivierung und Funktion von GPR40 abhängig ist [57].

Der Einfluss von GPR40 auf die fettsäureinduzierte Insulinsekretion in β -Zellen war auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Schwerpunkt war dabei, funktionelle Parallelen von GPR40 in den L-Zellen im Darm und den β -Zellen im Pankreas herauszuarbeiten. INS-1E Zellen wurden mit den beiden langkettigen ungesättigten Fettsäuren α -Linolensäure und Ölsäure in Anwesenheit einer hohen und einer niedrigen Glukosekonzentration inkubiert. Bei einer niedrigen Glukosekonzentration (2,8 mmol/l) führte die Stimulation mit den Fettsäuren zu keiner erhöhten Insulinsekretion. Bei einer hohen Glukosekonzentration (16,7 mmol/l) konnte die Insulinsekretion durch die beiden Fettsäuren stimuliert werden. α -Linolensäure verstärkte die glukoseinduzierte Insulinsekretion konzentrationsabhängig. Somit konnte bestätigt werden, dass die fettsäureinduzierte Insulinsekretion glukoseabhängig ist [53, 63]. Dass die Fettsäuren nur in Anwesenheit von Glukose die Insulinsekretion stimulieren, kann als physiologische Absicherungsstrategie des Organismus interpretiert werden. Würden Fettsäuren auch in Abwesenheit von Glukose die Insulinsekretion stimulieren, so würde der Blutglukosespiegel durch die erhöhte Plasmainsulinkonzentration gesenkt werden und eine Hypoglykämie wäre die Folge [144]. Daher ist es physiologisch sinnvoll, dass die fettsäureinduzierte Insulinsekretion glukoseabhängig ist.

Um zu zeigen, dass der GPR40 Signaltransduktionsweg bei der fettsäureinduzierten Insulinsekretion eine wesentliche Rolle spielt, wurden INS-1E Zellen mit dem GPR40 Agonisten C40a stimuliert. Die Inkubation führte konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der glukoseinduzierten Insulinsekretion. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse anderer Studien [53, 55], und zeigen, dass GPR40 maßgeblich an der fettsäureinduzierten Insulinsekretion beteiligt ist. Ob GPR120 hierbei ebenfalls eine Rolle spielt, ist noch unklar. Bisher gibt es keine GPR120 spezifische Agonisten, mit Hilfe derer es möglich wäre, die Rolle des Rezeptors in der β -Zelle zu charakterisieren. Die GPR120 Expression in Ratteninseln ist im Vergleich zu GPR40 und GPR119 sehr viel niedriger, dagegen zeigten die Expressionsdaten der quantitativen PCR-Analyse bezüglich der humanen GPR120 Splicevarianten eine deutliche Expression der kurzen Splicevariante in humanem Pankreasgewebe. Deshalb sind weitere Untersuchungen mit GPR120 Agonisten oder GPR120 spezifischer siRNA notwendig, um die Rolle von GPR120 bei der Insulinsekretion letztendlich zu klären.

Der GPR119 Agonist C119 verstärkte in den INS-1E Zellen die glukoseinduzierte Insulinsekretion konzentrationsabhängig. Dieses Ergebnis bestätigt die Daten der Firma Arena, die mit der Entwicklung dieser Substanz zeigen konnte, dass GPR119 ein glukoseabhängiger insulinotroper Rezeptor ist [117]. In der Arbeit von Chu et al. [62] konnte bestätigt werden, dass GPR119 ein β -Zellrezeptor ist, der die cAMP Akkumulation signifikant erhöht und dadurch die glukoseabhängige Insulinsekretion stimuliert.

Diese in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die amplifizierende Rolle von GPR40 und GPR119 bei der glukoseinduzierten Insulinsekretion in INS-1E Zellen wurde mit Hilfe der Min6c4 Zellen verifiziert.

4.3.2 Insulinsekretionsstudien aus primären Ratten- und Mausinseln

Entsprechend den Untersuchungen der GLP-1 Sekretion am Ratten ex vivo L-Zellmodell, wurde die Insulinausschüttung ebenfalls ex vivo in primären Ratteninseln untersucht. Die Stimulierung mit α -Linolensäure, Ölsäure und Docosahexaensäure verstärkten die glukoseinduzierte Insulinsekretion konzentrationsabhängig. Dass Ölsäure die glukoseinduzierte Insulinsekretion in primären Ratteninseln konzentrationsabhängig stimuliert, wurde bereits von Fujiwara et al. [144] gezeigt. In dieser Arbeit wurden primäre isolierte Ratteninseln mit Ölsäure bei 2,8 mmol/l und 11,2 mmol/l Glukose stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass Ölsäure nur bei 11,2 mmol/l Glukose die Insulinsekretion beeinflusst, d.h. als Potentiator der glukoseinduzierten Insulinsekretion wirkt.

Die Stimulation mit den GPR40 Agonisten C40a führte auch ex vivo zu einer Erhöhung der glukoseinduzierten Insulinsekretion.

Diese Sekretionsstudien an den β -Zell-in vitro und -ex vivo Modellen bestätigen, dass die fettsäureinduzierte Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas über GPR40 vermittelt und glukoseabhängig ist. Somit können bezüglich der rezeptorvermittelten Signaltransduktionskaskade eindeutige Parallelen zwischen der fettsäureinduzierten GLP-1 Sekretion aus den L-Zellen im Darm und der fettsäureinduzierten Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas beobachtet werden. Fettsäuren binden an GPR40 und GPR120 und stimulieren $G_{\alpha q}$ -gekoppelt die Hormonsekretion aus den Zellen. Die fettsäureinduzierte GLP-1 Sekretion aus den L-Zellen ist jedoch unabhängig von anderen Faktoren und ist in der zweiten Sekretionsphase maßgeblich für die Hormonausschüttung verantwortlich. Dagegen

ist die fettsäureinduzierte Insulinsekretion aus den β -Zellen glukoseabhängig, d.h. die Fettsäuren wirken in den β -Zellen als Potentioren und nicht als Initiatoren der Insulinsekretion.

Der GPR119 Agonist C119 stimulierte die Insulinsekretion aus primären Ratteninseln glukose- und konzentrationsabhängig. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von Chu et al. [62], die mit Hilfe eines GPR119 Agonisten in primären Mausinseln gezeigt haben, dass GPR119 die glukoseinduzierte Insulinsekretion verstärkt.

Dieser amplifizierende Mechanismus von GPR119 in Ratteninseln konnte erstmalig auch in den L-Zellen beobachtet werden. GPR119 verstärkt in L-Zellen die GPR40 induzierte GLP-1 Sekretion in vitro und ex vivo. Somit ist die β -Zelle, die bereits sehr gut untersucht ist, ein geeignetes Modell, um die molekularen Mechanismen, die zur GLP-1 Sekretion in der L-Zelle führen, besser zu verstehen und zu charakterisieren. Diese Erkenntnisse über die amplifizierende Rolle von GPR40 und GPR119 bei der glukoseinduzierten Insulinsekretion in primären Ratteninseln wurde in primären Mausinseln verifiziert.

4.5 Apoptose und Proliferation von L-Zellen und β -Zellen in vitro

Die Apoptose- und Proliferationsmechanismen in den β -Zellen des Pankreas wurden in den vergangenen Jahren intensiv untersucht. Im Rahmen dieser Studien konnte gezeigt werden, dass GLP-1 die Apoptose in den β -Zellen hemmt und die Proliferation stimuliert [96, 97, 107, 145, 146]. Die proliferative Wirkung von GLP-1 involviert verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege, darunter die Stimulierung des PI3-K/ Akt Signalweges und die Aktivierung von CREB, was zur Aktivierung von Akt und PDX-1 führt [20, 97, 107]. Außerdem wird die Proliferation durch die Phosphorylierung von ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) einerseits über den PKA/ Ras/ Raf/ MEK/ ERK1/2 Signalweg [104] und andererseits über die PKA/ CREB/ ERK1/2 Signaltransduktionskaskade [99, 113], stimuliert. Es ist bekannt, dass ERK1/2 bei der Proliferation, Differenzierung und Adaptation vieler Zellen beteiligt ist [103] und dass die Aktivierung von Akt bei fundamentalen zellulären Funktionen wie Proliferation und Überleben von Zellen eine wichtige Rolle spielt [147]. Aktiviert wird die Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 sehr häufig über die Stimulierung GPCR-abhängiger Signaltransduktionskaskaden [148].

Da der zirkulierende GLP-1 Plasmaspiegel bei Typ 2 Diabetikern akut reduziert ist [149, 150] und die GLP-1 Eliminierung bei diesen Personen normal ist [151], wird angenommen, dass die GLP-1 Sekretion bei Typ 2 Diabetikern erniedrigt ist. Möglicherweise sind eine verminderte L-Zellproliferation und eine erhöhte L-Zellapoptose teilweise für diese reduzierte GLP-1 Sekretion verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von α -Linolensäure, Docosahexaensäure, Ölsäure und C40a sowie C119 auf die Aktivierung der Signalmoleküle ERK1/2 und Akt untersucht. Insulin diente bei der Untersuchung der Akt Phosphorylierung als Positivkontrolle. Lim et al. [11] zeigten, dass murine L-Zellen den Insulinrezeptor exprimieren und dass die Stimulierung der Zellen mit Insulin zu einer erhöhten Akt-Phosphorylierung führt. α -Linolensäure, Docosahexaensäure, Ölsäure und der GPR40 Agonist C40a, nicht aber der GPR119 Agonist C119 stimulierten die ERK1/2 und Akt Phosphorylierung in den STC-1 Zellen konzentrationsabhängig. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von GPR40 und GPR120 die ERK1/2 Phosphorylierung in STC-1 Zellen verstärkt [58, 114] und lassen vermuten, dass die Signaltransduktionswege, die über $G_{\alpha q}$ - aber nicht über $G_{\alpha s}$ -gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden, bei der ERK1/2 und Akt Phosphorylierung beteiligt sind. Katsuma et al. [114] zeigten, dass GPR120, nicht aber GPR40 an der Phosphorylierung von ERK1/2 beteiligt ist. Im Vergleich zu α -Linolensäure war die Wirkung von C40a auf die ERK1/2 und Akt Phosphorylierung schwächer (vgl. Abb. 3-31). Möglicherweise beeinflusst α -Linolensäure den ERK1/2 und den Akt Signaltransduktionsweg über GPR40 und GPR120, weshalb die α -Linolensäure induzierte Antwort stärker ist, unter Umständen ist C40a aber auch in diesem Assay nur ein partieller GPR40 Agonist.

Die Stimulation von Min6c4 Zellen mit α -Linolensäure, Docosahexaensäure, C40a und C119 führte ebenfalls zu einer Aktivierung der ERK1/2 und Akt Phosphorylierung. Im Gegensatz zu den STC-1 Zellen konnte die ERK1/2 und die Akt Phosphorylierung somit auch durch C119, d.h. über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration stimuliert werden. Die Wirkung einer erhöhten intrazellulären cAMP Konzentration auf die ERK1/2 und Akt Phosphorylierung ist somit zelltypabhängig [152]. Möglicherweise benötigt die $G_{\alpha s}$ -Kopplung in STC-1 Zellen einen Costimulus, z.B. die Aktivierung eines Ionenkanals oder die Aktivierung eines $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptors, um die ERK1/2 und Akt Phosphorylierung zu stimulieren.

Itho et al. [53] zeigten, dass langkettige ungesättigte Fettsäuren die ERK1/2 Phosphorylierung in den Min6 Zellen aktivieren und in einer kürzlich publizierten

Arbeit konnte gezeigt werden, dass Oleat aber nicht Palmitat die ERK1/2 Phosphorylierung in der murinen Insulinomazelllinie NIT-1 Zelllinie stimuliert [153]. Die Transfektion der Zellen mit GPR40 spezifischer siRNA führte zu einer Reduktion der Oleat-induzierten ERK1/2 Phosphorylierung um 80%, d.h. in den β -Zellen ist GPR40 maßgeblich an der fettsäureinduzierten ERK1/2 Phosphorylierung beteiligt [153], was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Somit ist die fettsäureinduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt in den L-Zellen und β -Zellen GPR40 vermittelt, wobei in den L-Zellen neben GPR40 vermutlich auch GPR120 an der Aktivierung dieses Signalweges beteiligt ist, in den β -Zellen hingegen kann die ERK1/2 Phosphorylierung zusätzlich durch GPR119 stimuliert werden.

Aufgrund dessen, dass die Aktivierung von ERK1/2 und Akt zu einer erhöhten Proliferation und zu einer erniedrigten Apoptose in β -Zellen führt [96, 99, 104, 154], stellte sich die Frage, welche Bedeutung die Aktivierung der beiden Signalmoleküle in den L-Zellen hat. Daher wurde der Einfluss von α -Linolensäure, Docosahexaensäure, C40a und C119 auf die Proliferation in den L-Zellen in vitro untersucht. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass die langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren und C40a zu einer erhöhten Proliferation in L-Zellen in vitro führen. Keinen Einfluss auf die Proliferation zeigte dagegen C119.

Langkettige ungesättigte Fettsäuren stimulieren in β -Zellen nicht nur die Proliferation, sondern schützen sie auch vor der pro-apoptotischen Wirkung gesättigter Fettsäuren [153, 155, 156]. Die Mechanismen, die für diese anti-apoptotische Wirkung verantwortlich sind, waren lange Zeit nicht bekannt. Zhang et al. [153] zeigten, dass langkettige ungesättigte Fettsäuren in den β -Zellen in vitro die Apoptose, ausgelöst durch Palmitat, inhibieren, indem der ERK1/2 Signaltransduktionsweg über GPR40 aktiviert wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Min6c4 Zellen mit dem Cytotoxin Staurosporin und mit einem cytotoxischen Cytokincocktail aus TNF- α , IL-1 β und IFN- γ stimuliert, um die Apoptose in den Zellen zu stimulieren. Die staurosporin- und cytokininduzierte Caspase-3 Aktivität wurde durch α -Linolensäure und C40a inhibiert. Diese Ergebnisse bestätigten die Daten von Zhang et al. [153], dass langkettige ungesättigte Fettsäuren über GPR40 der Apoptose in β -Zellen entgegenwirken. In STC-1 Zellen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass einer Apoptoseinduktion durch Staurosporin, Palmitat und TNF- α durch α -Linolensäure und C40a entgegengewirkt werden kann. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten von Katsuma

et al. [114], die zeigten, dass langkettige ungesättigte Fettsäuren, wie α -Linolensäure, die Apoptose in STC-1 Zellen inhibierten.

Die Abnahme der β -Zellmasse und β -Zellfunktion sind beim Typ 2 Diabetes charakteristisch, deshalb spielt die Aufrechterhaltung und die Erhöhung funktioneller β -Zellen bei der Therapie des Typ 2 Diabetes eine wesentliche Rolle [83, 84, 85]. Welche Vorteile eine Stimulierung der Proliferation und eine Hemmung der Apoptose der L-Zellen im Darm hat, ist bisher noch nicht geklärt. Möglicherweise ist die reduzierte GLP-1 Sekretion bei Typ 2 Diabetikern auf eine erhöhte Apoptose und eine verminderte Proliferation der L-Zellen zurückzuführen. Durch eine Stimulierung von GPR40 und GPR120 könnte die Proliferation der L-Zellen erhöht werden und der Apoptose entgegengewirkt werden. Dadurch könnte der Plasmaspiegel an biologisch aktivem GLP-1 erhöht werden, wodurch die Insulinsekretion aus den β -Zellen verstärkt stimuliert werden könnte.

5 Schlussfolgerung

Der Anspruch der vorliegenden Arbeit bestand darin, die molekularen Mechanismen, die zur GLP-1 Sekretion aus der L-Zelle führen, in Anlehnung an die Mechanismen, die in der β -Zelle die Insulinsekretion stimulieren, zu untersuchen und zu charakterisieren.

Die Gesamtheit der in dieser Arbeit erhobenen Daten, lassen den Schluss zu, dass in der L-Zelle, die zwischen den Enterozyten im Ileum und Kolon lokalisiert ist, die G-Protein gekoppelten Rezeptoren GPR40, GPR120 und GPR119 exprimiert werden und dass diese Rezeptoren über $G_{\alpha q}$ - und $G_{\alpha s}$ -gekoppelte Signaltransduktionswege einerseits die GLP-1 Sekretion aus den L-Zellen stimulieren, andererseits die Proliferation und Apoptose dieser Zellen beeinflussen (Abb. 5-1).

Die biologische Funktion der $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptoren GPR40 und GPR120 liegt darin, in der zweiten GLP-1 Sekretionsphase, durch die Bindung von langkettigen ungesättigten Fettsäuren die GLP-1 Freisetzung zu stimulieren. Im Vergleich zur glukoseinduzierten Insulinsekretion in den β -Zellen, die über die $G_{\alpha s}$ - und $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Signalwege, stimuliert durch GPR40 und GPR119, verstärkt wird, wird auch in der L-Zelle die $G_{\alpha q}$ -induzierte GLP-1 Sekretion durch die $G_{\alpha s}$ -gekoppelte Signaltransduktion, stimuliert durch GPR119, amplifiziert. Die Daten der Arbeit geben Hinweise darauf, dass die postprandiale GLP-1 Sekretion, stimuliert durch Fettsäuren aus der Nahrung, durch einen synthetischen Rezeptoragonisten erhöht werden kann. Jedoch muss diese Hypothese mit Hilfe von in vivo Experimenten und Probandenstudien untersucht werden. Die Charakterisierung der molekularen Signalwege, die bei der GLP-1 Sekretion aus den L-Zellen beteiligt sind, kann somit helfen, in vivo neue Wege zu finden, die GLP-1 Sekretion zu verstärken. Allein oder in Kombination mit einem DPP IV Inhibitor könnte eine neue therapeutische Strategie entwickelt werden, die Insulinsekretion durch eine Steigerung der postprandialen GLP-1 Sekretion bei Typ 2 Diabetikern zu erhöhen.

Die in vitro nachgewiesene Stimulation der Proliferation und Inhibition der Apoptose in L-Zellen, induziert durch GPR40 und GPR120, zeigt, dass die Stimulierung von $G_{\alpha q}$ -Proteinen in L-Zellen weitere Signalkaskaden aktiviert. Bei Typ 2 Diabetikern ist die GLP-1 Sekretion vermindert, wobei nicht klar ist, ob die reduzierte Sekretion mit einer verminderten L-Zellproliferation und -apoptose in Verbindung steht. In der Annahme, dass dies der Fall ist, würde eine verstärkte Aktivierung von GPR40 und

GPR120 die GLP-1 Sekretion über zwei unterschiedliche Wege stimulieren, einerseits über die direkte Stimulierung der GLP-1 Sekretion und andererseits könnte die GLP-1 Freisetzung durch eine verstärkte L-Zellproliferation und eine verminderte L-Zellapoptose erhöht werden (Abb. 4-1). Die Gültigkeit dieser These bezüglich Proliferation und Apoptose der L-Zellen beschränkt sich bisher aber nur auf die L-Zelllinie STC-1. Um fundierte Aussagen treffen zu können, ist die Überprüfung dieses aufgestellten Modells in weiteren L-Zellmodellen sowohl in vitro wie auch in vivo notwendig.

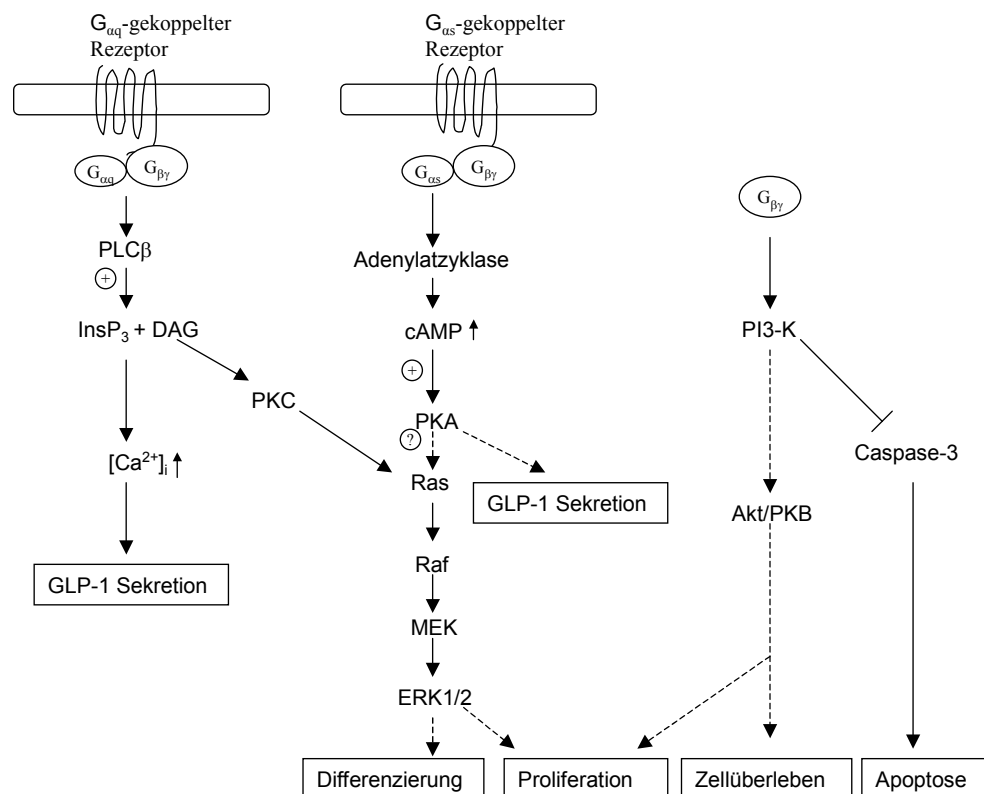


Abb. 4-1 Modell zur Signaltransduktion von $G_{\alpha q}$ - und $G_{\alpha s}$ -gekoppelten Rezeptoren in L-Zellen. Die Aktivierung der $G_{\alpha q}$ -Untereinheit führt zu der Bildung von IP₃ (D-myo-inositol 1,4,5-phosphat) und DAG (Diazylglyzerol), die die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration stimulieren ($[Ca^{2+}]_i$) und die Signaltransduktionskaskade führt zur Phosphorylierung von ERK1/2. Die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ induziert im Fall der L-Zellen die GLP-1 Sekretion. Die Phosphorylierung von ERK1/2 führt u.a. zur Zelldifferenzierung und –proliferation. Die Aktivierung der $G_{\alpha s}$ -Untereinheit induziert eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration, die die PKA (Proteinkinase A) aktiviert, die die GLP-1 Sekretion in L-Zellen amplifiziert. Ob PKA einen Einfluss auf den Ras/ Raf/ MEK/ ERK1/2 hat, muss noch geklärt werden. PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) kann über die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit aktiviert werden. PI3K stimuliert auf der einen Seite die Akt Phosphorylierung, die zu einer erhöhten Zellproliferation und Zellüberleben führt. Auf der anderen Seite inhibiert PI3K die Aktivierung der Caspase-3 und inhibiert dadurch die Zellapoptose. PLC β , Phospholipase C β , PKC, Proteinkinase C, MEK, MAP Kinase/ERK Kinase, ERK, extracellular signal-regulated kinase, MAPK, mitogen-activated protein kinase, PKB, Proteinkinase B.

6 Zusammenfassung

Dem insulinotropen Peptidhormon Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) kommt als potentielles Therapeutikum bei der Therapie des Typ 2 Diabetes eine wesentliche Rolle zu. Während die molekularen Mechanismen der Wirkung von GLP-1 an der β -Zelle der Langerhans'schen Inseln des Pankreas untersucht und aufgeklärt sind, ist bis zum heutigen Tag über die Mechanismen, die bei der GLP-1 Sekretion aus den L-Zellen im Darm eine Rolle spielen, sehr wenig bekannt. Jedoch scheint die Regulation der GLP-1 Sekretion aus den L-Zellen der Regulation der Insulinsekretion aus den β -Zellen ähnlich zu sein, wobei in der β -Zelle eine Reihe von G-Protein gekoppelten Rezeptoren die Insulinsekretion und weitere Signaltransduktionskaskaden beeinflussen. Aufgrund der Tatsache, dass die drei G-Protein gekoppelten Rezeptoren GPR40, GPR119 und GPR120 sowohl in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas wie auch in den L-Zellen des Darms exprimiert werden, beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit der Bedeutung der drei Rezeptoren sowie ihren intrazellulären Signalwegen in der L-Zelle und der β -Zelle.

GPR40, GPR120 und GPR119 sind in den enteroendokrinen L-Zellen im Rattenileum und -kolon zwischen den Enterozyten mit GLP-1 colokalisiert. Darüber hinaus ist GPR119 in den pankreatischen β -Zellen mit Insulin colokalisiert. GPR40 und GPR120 sind $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptoren, Liganden sind langkettige ungesättigte Fettsäuren. GPR119 ist ein $G_{\alpha s}$ -gekoppelter Rezeptor, der durch die Bindung von Lipiden wie Oleylethanolamid aktiviert werden kann. Die Aktivierung dieser drei Rezeptoren durch selektive und unselektive Agonisten stimulierte die GLP-1 Sekretion und die glukoseinduzierte Insulinsekretion in vitro und ex vivo, wobei GPR119 die $G_{\alpha q}$ -induzierte GLP-1 Freisetzung verstärkte. Synthetische Rezeptoragonisten waren in der Lage, die fettsäureinduzierte GLP-1 Sekretion additiv zu erhöhen. Stimuliert werden konnte die GLP-1 Sekretion außerdem durch Glukose.

In L-Zellen und β - Zellen wurde in vitro gezeigt, dass GPR40, GPR119 und GPR120 über verschiedene Signalwege die Zellproliferation stimulieren und die Zellapoptose inhibieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der Bedeutung von GPR40, GPR119 und GPR120 und deren Signaltransduktionswege für die Funktion der L-Zelle und β -Zelle geleistet.

7 Summary

The insulinotropic peptide hormone Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) led to intense interest in the use of this peptide for the treatment of patients with type 2 diabetes. The molecular mechanisms of GLP-1 in the β -cells are examined and well understood, whereas the mechanisms leading to GLP-1 secretion in the L-cells are not understood in detail. However the regulation of GLP-1 secretion from intestinal L-cells seems to be similar to the regulation of the insulin secretion in pancreatic β -cells. In the β -cells a number of G-protein coupled receptors influence the insulin secretion and other signal transduction cascades. Due to the fact, that the three G-protein coupled receptors GPR40, GPR119 and GPR120 are expressed in pancreatic β -cells as well as in the intestinal L-cells, the present studies concentrated on the expression and importance of the three receptors and on their intracellular effects in the L-cells and in the β -cells.

GPR40, GPR119 and GPR120 are colocalized with GLP-1 in the enteroendocrine L-cells in the rat ileum and colon between the enterocytes. Moreover GPR119 is colocalized with insulin in the pancreatic β -cells. GPR40 and GPR120 are G_{α_q} -coupled receptors, ligands are longchain unsaturated free fatty acids. GPR119 is a G_{α_s} -coupled receptor being activated by lipids like oleylethanolamide. Activation of the three receptors by selective and unselective agonists stimulates GLP-1 secretion and the glucose induced insulin secretion in vitro and ex vivo, whereas GPR119 amplifies the G_{α_q} -induced GLP-1 secretion. Synthetic agonists were able to enhance the fatty acid induced GLP-1 secretion in an additive manner. Glucose also stimulated the GLP-1 secretion in vitro and ex vivo.

In L-cells and β -cells it has been shown that GPR40, GPR119 and GPR120 stimulate cell proliferation and inhibit cell apoptosis via different signal transduction pathways in vitro.

Hence the present studies make a contribution to the understanding of the importance of GPR40, GPR119 and GPR120 and their signal transduction pathways for the function of the L-cell and the β -cell.

8 Literatur

1. Druce MR., Small CJ., and Bloom SR. (2006) Minireview: Gut peptides regulating satiety. *Endocrinology*, 145(6): 2660-2665
2. Strader AD, and Woods SC. (2005) Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology*, 128: 175-191
3. Rehfeld JF. (1998) The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiological Reviews*, 78: 1087-1108
4. Lund PK, Goodman RH, Montminy MR, Dee PC, and Habener JF. (1983) Angler fish islet pre-proglucagon I. Nucleotide and corresponding amino acid sequence of the cDNA. *J Biol Chem*, 258:3280-3284
5. Kieffer TJ., and Habener JF. (1999) The Glucagon-like peptides. *Endocrine reviews*, 20(6): 876-913
6. Holst JJ. (1997), Enteroglucagon, *Annu Rev Physiol*, 59:257-271
7. Ahren, Bo. (1998) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): a gut hormone of potential interest in the treatment of diabetes. *BioEssays*, 20: 642-651
8. Eissele, R., Göke, R., Willeer, S., Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, and Göke B. (1992) Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European J Clin Invest*, 2:283-291
9. Ahren B., Larsson H, and Holst JJ. (1997) Effects of glucagons-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endo & Meta*, 82: 473-478
10. Anini Y., Hansotia T., and Brubaker PL. (2002) Muscarinic receptors control postprandial release of glucagon-like peptide-1: in vivo and in vitro studies in rats. *Endocrinology*, 143: 2420-242

-
11. Lim GE, and Brubaker PL. (2006) Glucagon-like peptide 1 secretion by the L-cell. *Diabetes*, 55: S70-S77
 12. Cummings DE, and Overdin J. (2007) Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest*, 117:13-23
 13. Orskov C., Rabenhoj L., Wettergren A., Kofold H. Holst JJ. (1994) Tissue and plasma concentrations of amided and glycine-extended glucagon-like peptide 1 in humans. *Diabetes*, 43: 535-539
 14. Jang H.J., Kokrashvili Z., Theodorakis M.J., Carlson O., Kim B.J., Zhou J., Kim H.H., Xu X., Juhaszova M., Bernier M., Mosinger B., Margolskee R.F., and Egan J.M. (2007) Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagons-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (38):15069-15074
 15. Kreymann B., Williams G. Ghatel MA, and Bloom S. (1987): Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*, 330: 1300-1304
 16. Nauck MA., Kleine N., Orskov C., Holst JJ., Willms B., and Creutzfeldt W. (1993) Normalization of fasting hyperglycemia by endogenous glucagons-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin dependent) diabetic patients. *Diabetologia*, 36: 741-744
 17. Ahren B., Larsson H, and Holst JJ. (1997) Effects of glucagons-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endo & Meta*, 82: 473-478
 18. Ritzel R., Orskov C., Holst JJ., and Nauck MA. (1995) Pharmacokinetics, insulinotropic, and glucagonostic properties of GLP-1 (7-36 amide) after subcutaneous injection in healthy volunteers. Dose-response-relationships. *Diabetologia*, 38:720-725
 19. Nauck MA. (1998) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective, *Acta Diabetol*, 35:117-129

-
20. Drucker JD. (2006) The biology of incretin hormones. *Cell metabolism*, 3: 153-165
 21. Drucker DJ., Philippe J., Mojsov S., Chick WL., and Habener JF. (1987) Glucagon-like peptide-1 stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 3434-3438
 22. Fehmann HC., and Habener JF. (1991) Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 (7-37) on a somatostatin cell line. *FEBS Lett*, 279: 335-340
 23. Stoffers DA., Kieffer TJ., Hussain MA., Drucker DJ., Egan JM., Bonner-Weir S., Habener JF. (2000) Insulinotropic glucagon-like peptide-1 agonists stimulate expression of homeodomain IDX-1 and increase β -cell mass in mouse pancreas. *Diabetes*, 49: 741-748
 24. De Léon DD., Deng S., Madani R., Ahima RD., Drucker DJ., and Stoffers DA. (2003) Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration following partial pancreatectomy. *Diabetes*, 52: 365-371
 25. Hui H., Nourparvar A., Zhao X., and Perfetti R. (2003) Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein-kinase A and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *Endocrinology*, 144: 1444-1455
 26. Xu G., Stoffers DA., Habener JF., and Bonner-Weir S. (1999) Exendin-4 stimulates both β -cell replication and neogenesis, resulting in increased β -cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*, 48: 2883-2889
 27. Edvell A., and Linström P. (1999) Initiation of increased pancreatic islet growth in young normoglycemic mice (Umea +/-). *Endocrinology*, 140: 778-783
 28. Creutzfeldt W. (1979) The incretin concept today. *Diabetologia*, 16: 75-85
 29. Unger RH., and Eisentraut AM. (1969) Entero-insular axis. *Arch Intern Med*, 123: 261-266

-
30. Gallwitz B. (2005) New therapeutic strategies for the treatment of type 2 diabetes mellitus based on incretins. *The review of diabetic studies*, 2:61-69
 31. Langley A.K., Sulfoletta T.J., and Jennings H.R. (2007) Dipeptidyl peptidase IV inhibitors and the incretin system in type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy*, 27 (8), 1163-1180
 32. Elliott RM., Morgan LM., Tredger JA., Deacon S., Wright J., and Marks V. (1993) Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide and glucose dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post prandial and 24h secretion patterns. *J Endocrinol*, 138: 159-166
 33. Herrmann C., Göke R., Richter G., Fehmann HC., Arnold R., and Göke B. (1995) Glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion*, 56: 117-126
 34. Abello J., Ye F., Bosshard A., Bernard C., Cuber J.C., and Chayvialle J.A. (1994) Stimulation of glucagon-like peptide-1 secretion by muscarinic agonist in a murine intestinal endocrine cell line. *Endocrinology*, 134 (5), 2011-2017
 35. Balks H.H., Holst J.J., von zur Mühlen A., and Brabant G. (1997) Rapid oscillations in plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in humans: cholinergic control of GLP-1 secretion via muscarinic receptors. *J Clin Endocrinol Metab*, 82 (3), 786-790
 36. De Léon DD., Crutchlow MF., Nina Ham JY., and Stoffers DA. (2006) Role of glucagons-like peptide-1 in the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol*, 38: 845-859
 37. Bojanowoska E. (2005) Physiology and patho physiology of glucagons-like peptide-1: the role of GLP-1 in the pathogenesis of diabetes mellitus, obesity and stress: *Med Sci Monit*, 11: RA271-RA278
 38. Combettes, M. (2006) GLP-1 and type 2 diabetes: physiology and new clinical advances. *Current Opinion in Pharmacology*, 6: 598-605

-
39. Plaisancie P., Bernard C., Chayvialle JA., and Cuber JC. (1994) Regulation of Glucagon-like peptide-1-(7-36) amide secretion by intestinal neurotransmitters and hormones in the isolated vascularly perfused rat colon. *Endocrinology*, 135: 2398-2403
 40. Rocca A.S., and Brubaker P.L. (1999) Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology*, 140 (4), 1687-169
 41. Anini Y., and Brubaker PL. (2003) Muscarinic receptors control glucagons-like peptide-1 secretion by human endocrine L cells. *Endocrinology*, 144: 3244-3250
 42. Adachi T., Tanaka T., Takemoto K., Koshimizu T., Hirasawa A., and Tsujimoto G. (2006) Free fatty acids administration into the colon promote the secretion of glucagons-like peptide-1 and insulin. *BBRC*, 340: 332-337
 43. Theodorakis MJ., Carlson O., Michopoulos S., Doyle ME., Juhaszovz M., Petraki K., Egan JM. (2006) Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290: 550-559
 44. Roberge JN., and Brubaker PL. (1993) Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology*, 133: 233-240
 45. Reimann F., and Gribble FM. (2002) Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes* 2002, 51: 2757-2763
 46. Gribble FM., Williams L., Simpson AK., and Reimann F. (2003) A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagons-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes*, 52: 1147-1154

-
47. Ritzel U., Fromm A., Oettleben M., Leonardt U., and Ramadori G. (1997) Release of glucagons-like peptide-1 (GLP-1) by carbohydrates in the perfused rat ileum. *Acta Diabetol*, 34:18-21
 48. Holst PJ., Christiansen JJ., Holst JJ., Krarup T., Hint K, and Palmgren N. (1990) Inhibition of gastric acid secretion by jejunal glucose and its relation to osmolarity and glucose load. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 25:103-111
 49. Rayner CK., Park HS., Wishart JM., Kong MF., and Doran SM, Horwitz M. (2000) Effects of intraduodenal glucose and fructose on antropyloric motility and appetite in healthy humans. *A J Physiol.*, 278: R360-R366
 50. Shima K., Suda T., Nishimoto K., and Yoshimoto S. (1990) Relationship between moleculare structures of sugars and their ability to stimulate the release of glucagons-like peptide-1 form canine ileal loops. *Acta Endocrin*, 123: 464-470
 51. Reimer RA., Darimont C., Gremlich S., Nicolas-Métral V., Rüegg UT., and Macé K. (2001) A human cellular model for studying the regulation of Glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology*, 142: 4522-4528
 52. Brubaker PL., Schloss J., and Drucker J. (1998) Regulation of Glucagon-like peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line. *Endocrinology*, 139: 4108-4114
 53. Itho 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 F., Fujisawa Y., and Fujino M. (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β -cells through GPR40. *Nature*, 422: 173-176
 54. Briscoe CP., Tadayyon M., Andrews JL., Benson WG. Chambers JK., Eilert MM., Ellis C., Elshourbagy NA., Goetz AS., Minnick DT., Murdock HR., Sauls HR., Shabon U., Spinage LD., Sturm JC., Szekeres PG., Tan KB., Way JM.,

-
- Ingar DM., Wilson S., and Muir AI. (2003) *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 11303
55. Salehi A., Flodgren E., Nilsson NE., Jimenez-Feltstrom J., Miyazaki J., Owman C., and Olde B. (2005) Free fatty acid receptor 1 (FFA1R/ GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion. *Cell Tissue Res*, 322: 207-215
56. Shapiro H., Shachar S., Sekler I., Hershinkel M., and Walker MD. (2005) Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun*, 335(1):97-104
57. Flodgren E., Olde B., Meidute-Abaraviviene S., Sörede-Winzell M., Ahrén B., and Salehi A. (2007), *Biochem Biophys Res Commun*, 354(1):240-245
58. Hirasawa A., Tsumaya K., Awji T., Katsuma S., Adachi T., Yamada M., Sugimoto Y., Miyazaki S., and Tsujimoto G. (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*, 11(1):90-4
59. Chu ZL., Leonard JN., Al-Shamma HA., and Jones RM. (2006) International Patent Publication WO2006/076231
60. Bonini J.A., Borowsky B.E., Adham N., Boyle N., and Thompson T.O. (2002) U.S. Patent 6.468.756
61. Fredriksson R., Hoglund PJ, Gloriam DE, Lagerstrom MC, and Schiöth HB. (2003), Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett*, 554: 381-388
62. Chu ZL., Jones RM., Hongmei H., Carroll C., Gutierrez V., Lucman A., Moloney M., Gao H., Mondala H., Bagnol D., Unett D., Liang Y., Demarest K., Semple G., Behan D.P, and Leonard J (2007). A role of β -cell- expressed GPR119 in glycemic control by enhancing glucose-dependent insulin release. *Endocrinology* 146(6): 2601-2609
-

-
63. Soga T., Ohishi T., Matsui T., Saito T., Matsumoto M., Takasaki J., Matsumoto S., Kamohara M., Miyama H., Yoshida S., Momose K., Ueda Y., Matsushime H., Kobori M., and Furuichi K. (2005) Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 744-751
 64. Brown AJ. (2007), Novel cannabinoid receptors, *British Journal of Pharmacology* 152(5):567-75
 65. Katsuma S., Hirasawa A., and Tsujimoto G. (2005) Bile acids promote glucagons-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 136: 386-390
 66. Cordier-Bussat M., Bernard C., Levenez F., Klages N., Laser-Ritz B., Philippe J., Chayvialle JA., and Cuber JC. (1998) Peptones stimulate both the secretion of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 and the transcription of the proglucagon gene. *Diabetes*;47(7):1038-45
 67. Reimer RA. (2006) Meat hydrolysate and essential amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion, in the human NCI-H716 enteroendocrine cell line, is regulated by extracellular signal-regulated kinase1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Endocrinol*, 191(1):159-70
 68. Deacon CF. (2005) What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? *Regulatory Peptides*, 128: 117-124
 69. Kolterman OG., Buse JB., Fineman MS., Gaines E., Heintz S., Bicsak TA., Taylor K., Kim D., Aisporna M., Wang Y., and Baron A. Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:3082-3089
 70. Rasmussen H., Zawalich KC., Ganesan S., Calle R., and Zawalich WS. (1990) Physiology and pathophysiology of insulin secretion. *Diabetes Care*, 13: 65-666
 71. Ammon HPT. (1995) Wege der Nachrichtenübermittlung bei der Stimulation der Sekretion von Insulin. *Diabetes und Stoffwechsel*, 4: 311-320
-

-
72. Rustenbeck I., Herrmann C., and Grimmsmann T. (1997) Energetic requirement of insulin secretion distal to calcium influx. *Diabetes* 197, 46: 1305-1311
 73. Henquin JC. (2000) Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*, 49:1751-1760
 74. Holz GG. (2004) Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagons-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes*, 53: 5-13
 75. Nauck MA., Holst JJ., Willms B., and Schmiegel W. (1997) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) as a new therapeutic approach for type 2-diabetes. *Exp. Clin Endocrin. Diabetes*, 104: 187-195
 76. Holst JJ. (1999), Glucagon-like peptide-1, a gastrointestinal hormone with a pharmaceutical potential. *Curr Med Chem*, 6: 1005-1017
 77. Overton HA., Babbs AJ., Doel S.M., Fyfe MCT., Gardner LS., Griffin G., Jackson HC., Procter MJ., Rasamison CM., Tang-Christensen M., Widdowson PS., Williams GM., and Reynet C. (2006) Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab*, 3, 167-175
 78. Mayor S. (2006), Diabetes effects nearly 6 % of the world`s adults. *Bmj* 333: 1191
 79. Ahrén B. (2005) Type 2 diabetes, insulin secretion and beta-cell mass, *Curr Mol Med*. 5(3):275-86
 80. Dotta F., Fondelli C., and Di Mario U. (2005) Type 1 diabetes mellitus as a polygenic multifactorial disease: immunopathogenic mechanisms of beta-cell destruction. *Acta Biomed*, 76 Suppl 3:14-8

-
81. Cavan D, Bain S, and Barnett A. (1992) The genetics of type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *J Med Genet*, 29(7):441-6
 82. Kahn SE., Hull RL., and Utzschneider KM. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444: 840-846
 83. DeFronzo RA., Ratner RE., Han J., Kim DD., Fineman MS., and Baron AD. (2005) Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28: 1092-1100
 84. Gin H., Rigalleau V., and Aparicio M. (2000) Lipids, protein intake, and diabetic nephropathy. *Diabetes Metab. Suppl* 4:45-53
 85. Stumvoll M., and Jacob S. (1999) Multiple sites of insulin resistance: muscle, liver and adipose tissue. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 107(2):107-10
 86. Rayasam GV., Tulasi VK., Davis JA., and Bansal VS. (2007) Fatty acid receptors as new therapeutic targets for diabetes. *Expert Opin Ther Targets*, 11(5):661-71
 87. Gudermann T., Nurnberg B., and Schultz G. (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part1. G-protein coupled receptors: structure and function. *J Mol Med*, 73: 51-63
 88. Pierce KL., Premont RT., and Lefkowitz RJ. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews*, 3: 639-650
 89. Strader CD., Fong TM., Tota MR., Underwood D., and Dixon RA. (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*, 63: 101-132
 90. Ji TH., Grossmann M., and Ji L. (1998) G protein-coupled receptors I.. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*, 273: 17299-17302

-
91. Birnbaumer L. (1992) Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell*, 71: 1069-1072
 92. Hildebrandt JD.(1997) Role of subunit diversity in signalling by heterotrimeric G proteins. *Biochem Pharmacol*;54(3):325-39
 93. Hamm HE., and Gilchrist A. (1996), Heterotrimeric G proteins, *Curr Opin Cell Biol.*, 8(2):189-96
 94. Offermanns S. (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol*, 83: 101-130
 95. Lehninger AL., Nelson DL., and Cox MM. *Lehninger Biochemie* (Springer Lehrbuch), 3. Auflage, ISBN 3-540-41813-X
 96. Brubaker PL., and Drucker DJ. (2005) Minireview: Glucagon-like peptide regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut and central nervous system. *Endocrinology*, 145: 2653-2659
 97. Wang X., Cahill CM., Pineyro MA., Zhou J., Doyle ME., and Egan JM. (1999) Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology*, 140: 4904-4907
 98. Kim JG., Baggio LL., Bridon DP., Gotfredsen CF., Deacon CF., Carr RD., Wilken M., and Knudsen LB. (2003) Development and characterization of a glucagons-like peptide 1-albumin conjugate: the ability to activate the glucagons-like peptide-1 receptor in vivo. *Diabetes*, 52: 751-759
 99. Costes S., Broca C., Bertrand G., Lajoix AD., Bataille D., Bockaert J., and Dalle S. (2006) ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-response element-binding protein. *Diabetes*, 55: 2220-2230
 100. Buteau J., Roduit R., Susinin S., and Prentki M. (1999) Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activated phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenum homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in β (INS-1)-cells. *Diabetologia*, 42: 856-864

-
101. Buteau J., Foisy S., Rhodes CJ., Carpenter L., Biden TJ., and Prentki M. (2001) Protein kinase C ξ activation mediates glucagons-like peptide-1-induced pancreatic β -cell proliferation. *Diabetes*, 50: 2237-2243
102. Trumper A., Trumper K., and Horsch D. Mechanisms of mitogenic and anti-apoptotic signalling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in β (INS-1)-cells (2002). *J Endocrinol*, 174: 233-246
103. Arnette D., Gibson TB., Lawrence MC., January B., Khoo S., McGlynn K., Vanderbilt CA., and Cobb MH. (2003) Regulation of ERK1 and ERK2 by glucose and peptide hormones in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, 278 (35), 32517-32525
104. List JF., and Habener JF. (2004) Glucagon-like peptide 1 agonists and the development and growth of pancreatic β -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286: E875-E881
105. Dickson LM., and Rhodes Cj. (2004) Pancreatic β -cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Medab*, 287: E192-E198
106. Jhala US., Canettieri G., Screatton RA., Kulkarni RN., Krajewski S., Reed J., Walker J., Lin X., White M., and Montimy M. (2003) cAMP promotes pancreatic β -cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev*, 17: 1575-1580
107. Perfetti R., Zhou J., Doyle ME., and Egan JM. (2000) Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology*, 141: 4600-4605
108. Miyazaki S., Yamato E., and Miyazaki J. (2004) Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes*, 53: 1030-1037
-

-
109. Nakjima-Nagata N., Sugai M., Sakurai T., Miyazaki J., Tabata Y., and Shimizu A. (2004) Pdx-1 enables insulin secretion by regulating synaptotagmin 1 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 318: 631-635
110. Benes C. Roisin MP. Van Tan H. Creuzet C. and Miyazaki J. Fagard . (1998): Rapid activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein-kinases in response to physiological concentration of glucose in the MIN6 pancreatic beta cell line. *J Biol Chem*, 273: 15507-15513
111. Briaud I., Lingohr MK., Dickson LM., Wrede CE., and Rhodes CF. (2003) Differential activation mechanisms of ERK1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic β -cells. *Diabetes*, 52:974-983
112. Frödin M., Sekine N., Roche E., Filloux C., Pentki M., Wollheim CB., and Van Obberghen E. (1995) Glucose, other secretagogues, a nerve factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta- cell line INS-1. *J Biol. Chem*, 270: 7882-7889
113. Khoo S., Griffen SC., Xia Y., Baer RJ., German MS., and Cobb MH. (2003) Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, 278: 32969-32977
114. Katsuma S., Hatae N., Yano T., Ruikes Y., Kimura M., Hirasawa A., and Tsujimoto G. (2005) Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *J Biol Chem*, 280: 19507-19515
115. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 7;72:248-54
116. Akerman M., Houze J., Lin DCH., Liu J., Luo J., Medina JC., Qiu W., Reagan JD., Sharman R., Schmitt J., Shuttleworth SJ., Sun Y., Wang Y., Zhang J., and Zhu L. (2006) United States Patent Application US2006/0004012

-
117. Jones RM., Semple G., Fioravanti B., Pereira G., Calderon I., Uy J., Duvvuri K., Choi JSK., Xiong Y., and Dave V. (2004) International Patent Application 2004/065380A1
118. Schnell S., Schaefer M., and Schöfl C. (2007) Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from beta-cells through activation of GPR40. *Mol Cell Endocrinol*, 263(1-2):173-80
119. Li JG., Chen C., and Chen LYL. (2007) N-Glycosylation of the human κ opioid receptor enhances its stability but slows its trafficking along the biosynthesis pathway. *Biochemistry*, 46: 10960-10970
120. Pfeffer SR., and Rothman JE. (1987) Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu Rev Biochem*;56:829-52
121. Sibley DR., Benovic JL., Caron MG., and Lefkowitz RJ. (1987) Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. *Cell*;48(6):913-22
122. Sakamoto Y., Inoue H., Kawakami S., Miyawaki K., Miyamoto T., Mizuta K., and Itakura M. (2006) Expression and distribution of Gpr119 in the pancreatic islets of mice and rats: Predominant localization in pancreatic polypeptide-secreting PP-cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 351(2):474-480
123. Matsumura S., Mizushige T., Yoneda T., Iwanaga T., Tsuzuki S., Inoue K., and Fushiki T. (2007) GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed Res* 28 (1), 49-55
124. Kotarsky K., Nilsson NE., Flodgren E., Owman C., and Olde B. (2003) A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun*;301(2):406-10
125. Iakoubov R., Izzo A., Yeung A., Whiteside C.I., and Brubaker P.L. (2007) Protein kinase C ζ is required for oleic acid-induced secretion of glucagon-like peptide-1 by intestinal endocrine L cells. *Endocrinology*, 148 (3): 1089-1098

-
126. Armand M., Borel P., Paquier B., Dubois C., Senft M., Andre M., Peyrot J., Salducci J., and Lairon A. (1996) Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *The American Journal of Physiology*, 271: G172- G183
127. Porter HP., and Saunders DR. (1971) Isolation of the aqueous phase of human intestinal contents during the digestion of a fatty meal. *Gastroenterology*, 60: 997-1007
128. Briscoe CP., Peat AJ., McKeown SC., Corbett DF., Goetz AS., Littleton TR., McCoy DC., Kenakin TP., Andrews JL., Ammala C., Fornwald JA., Ignar DM., and Jenkinson S. (2006) Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules. *Brit J Pharmacol*, 148: 619-628
129. Furman B., and Pygne N. (2006) Modulation of cyclic nucleotides and cyclic nucleotide phosphodiesterases in pancreatic islet beta-cells and intestinal L-cells as targets for treating diabetes mellitus. *Curr Opin Investig Drugs*, 7 (10): 898-905
130. Alberts B., Bray D., und Lewis J. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, Taylor & Francis, ISBN 0-8153-4073-9
131. Madiraju SR., and Poitout V. (2007), GPCRs and Insulin secretion: 119 and counting. *Endocrinology*, 148(6): 2598-2600
132. Convington DK., Briscoe CA., Brown AJ., and Jayawickreme CK. (2006) The G-protein-coupled receptor 40 family (GPR40-GPR43) and its role in nutrient sensing. *Biochemical Society Transactions*, 43(5): 770-773
133. Corkey E., Deeney JT., Yaney GC., Tornheim K., and Prentki M. (2000) The role of long-chain fatty acyl- CoA esters in beta-cell signal transduction. *The Journal of nutrition*, 130: 299S- 304S

-
134. Nolan CJ., Madiraju MS., Delghingaro-Augusto V., Peyou ML., and Prentki M. (2006) Fatty acid signalling in the β -cell and insulin secretion. *Diabetes*, 55: S16-S23
135. 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 of Malonyl-CoA/ long-chain acyl-CoA pathway of lipid signalling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes*, 53: 1007-1019
136. Rudermann N., and Prentki M. (2004) AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov*, 3:340-351
137. Latour MG., Alquier T., Oseid E., Tremblay C., Jetton TL., Luo J., Lin DC-H., and Poitout V. (2007) GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes* 56, 1087-1094
138. Milligan G., Stoddard LA., and Brown AJ. (2006) G protein-coupled receptors for free fatty acids. *Cellular Signal*, 18: 1360-1365
139. Haber EP., Ximenes HM., Procopio J., Carvalho CR., Curi R., and Carpinelli AR. (2003) Pleiotropic effects of fatty acids on pancreatic beta cells. *Journal of cellular Physiology*, 194: 1-12
140. Bollheimer LC., Skelly RH., Chester MW., McGarry JD., and Rhodes CJ. (1998) Chronic exposure to free fatty acids reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. *Journal of Clinical Invest*, 101: 1094- 1101
141. Steneberg P., Rubins N., Bartoov-Shifman R., Walker MD., and Edlund H. (2005) The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab*, 1: 245-258
142. McGarry JD., and Dobbins RL. (1998) Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia*, 42: 128-138
-

-
143. Winzell M.S., and Ahrén B. (2007) G-protein-coupled receptors and islet function-Implications for treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol Ther*, 116(3):437-48
144. Fujiwara K., Maekawa F., and Yada T. (2005) Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca^{2+} signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca^{2+} channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289(4):E670-E677
145. Stoffers DA., Kieffer T.J., Hussain MA., Drucker DJ., Egan J.M., Bonner-Weir S., and Habener J.F. (2000) Insulinotropic glucagon-like peptide-1 agonists stimulate expression of homeodomain IDX-1 and increase β - cell mass in mouse pancreas. *Diabetes*, 49: 741- 748
146. Tourel C., Bailbe D., Lacorne M., Meile M.-J., Kergoat M., and Portha B. (2002) Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto- Kokizaki rat model by expansion of the β - cell mass during the prediabetic period with glucagons-like peptide 1 or exendin-4. *Diabetes*, 51: 1443-1452
147. Osaki M., Oshimura M., and Ito H. (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9, 667-676
148. Gutkind J.S. (1998) Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*, 17: 1331-1342
149. Vilsbøll T., Agersø H., Krarup T., and Holst J.J. (2003) Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 88 (1): 220-224
150. Toft-Nielsen MB., Damholt MB., Madsbad S., Hilsted LM., Hughes TE., Michelsen BK., and Holst JJ. (2001) Determinants of the effectiveness of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **86** (8), 3717-3723
-

-
151. Vilsbøll T., Krarup T., Deacon C.F., Madsbad S., and Holst J.J. (2001) Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 50, 609-613
152. Chen Z., Gibson TB., Robinson F., Silvestro L., Pearson G., Xu B., Wright A., Vanderbilt C., Cobb MH. (2001) MAP kinases. *Chem Rev*, 101: 2449-2476
153. Zhang Y., Xu M., Zhang S., yan L., Yang C., Lu W., Li Y., and Cheng H. (2007) The role of G protein-coupled receptor 40 in lipoapoptosis in mouse β -cell line NIT-1. *J Molec Endocrinol*, 38: 651-661
154. Li L., El-Kholy W., Rhodes C.J., and Brubaker PL. (2005) Glucagon-like peptide 1 protects beta cells from cytokine-induced apoptosis and necrosis: role of protein kinase B, *Diabetologia* 48: 1339-1349
155. Maedler K., Spinas GA., Dyntar D., Moritz W., Kaiser N., and Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes*;50(1):69-76
156. Maedler K., Oberholzer J., Bucher P., Spinas GA., and Donath MY. (2003) Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes*, 52(3):726-33
157. Fukunaga S., Setoguchi S., Hirasawa A. and Tsujimoto G. (2006) Monitoring ligand-mediated internalization of G protein-coupled receptor as a novel pharmacological approach. *Life Sciences*, 80(1):17-23

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CREB	cAMP response element binding protein
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4'-6'-Diamidino-2 phenylindol
DMEM	Dulbecco' s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	Effective Concentration 50%
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et aliter; und andere
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum
FLIPR	Fluorometric Imagine Plate Reader
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd- 3- Phosphat- Dehydrogenase
GLP-1	Glucagon- like- peptide 1
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GSIS	Glukosestimulierte Insulinsekretion
h	Stunden
IP ₁	D-myo-Inositolmonophosphat
IP ₃	D-myo-1, 4, 5-phosphat
kDa	Kilodalton
l	Liter
MAP	mitogen-activated protein
MEK	mitogen-activated protein kinase Kinase
min	Minute
ml	Mililiter

mmol	Milimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
OEA	Oleylethanolamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction Polymerasekettenreaktion
PDX-1	pancreatic-duodenum homeobox-1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbolestermyristatazetat
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SGLT	Sodium dependent Glucose Transporter
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ mol	Mikromol

9.2 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt habe und bei der Verfassung der Arbeit keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe, sowie wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit oder eine andere Dissertation vorgelegt.

(Stefanie Leicht)

Ehingen, den 28.01.2008

9.3 Danksagung

Herrn Dr. Mark danke ich herzlich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und die Bereitstellung des Laborplatzes.

Bei Herrn Prof. Dr. Lutz Graeve möchte ich mich für die fachliche Überarbeitung der Arbeit und für die Übernahme des Erstgutachtens der Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Peter Eickelmann für seine unzähligen Anregungen zur Durchführung der Arbeit, sowie seiner ununterbrochenen, konstruktiven wissenschaftlichen Betreuung und Diskussionsbereitschaft. Vor allem aber möchte ich mich für seine fachliche sowie persönliche Unterstützung, die ein kreatives wissenschaftliches Arbeiten ermöglichte, bedanken. Ein herzliches Dankeschön gilt auch seinem Einsatz bei der Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. Remko Bakker und Frau Dr. Stefanie Mayet danke ich für ihre stets freundliche und hilfsbereite Diskussionsbereitschaft und für ihre geistigen und praktischen wissenschaftlichen Anregungen.

Allen Mitarbeitern im Labor danke ich von Herzen für die freundschaftliche Aufnahme, die kollegiale Zusammenarbeit und die vielfältige Unterstützung während meiner Arbeit.

Danken möchte ich meinen Eltern, die mir das alles erst ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Christian.

9.4 Lebenslauf

Stefanie Leicht

geb. am 04.08.1980 in Ehingen, ledig

Schule

27.06.2000 Abitur am Gymnasium Ehingen (Note 1,1)

Studium

10/2000 – 08/2005 Studium der Ernährungswissenschaft an der
Universität Hohenheim

01/2005 – 08/2005 Diplomarbeit: "Klonierung und funktionelle
Charakterisierung neuer SGLT-Gene",
Boehringer-Ingelheim, Biberach

25.08.2005 Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
(Note 1,0 mit Auszeichnung)

Promotion

09/2005 – 04/2008 Doktorarbeit: "Rolle der GPCR-Signaltransduktion bei
der Peptidhormonsekretion in neuroendocrinen Zellen
im Darm und im Pankreas",
Boehringer-Ingelheim, Biberach

15/04/06 – 04/2008 Graduiertenkolleg 1041 für Molekulare Diabetologie und
Endocrinologie in der Medizin, Universität Ulm

Praktika, berufliche Tätigkeiten

01/04/02 – 15/08/02 Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ),
Heidelberg, wissenschaftliche Hilfskraft

05/08/02 – 27/09/02 Hammermühle Diät GmbH, Kirrweiler, Spezialhersteller
von glutenfreien Lebensmitteln, Praktikantin

28/07/03 – 19/09/03 Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg, Labor für Forschung
und Entwicklung, Praktikantin

01/12/03 – 31/05/04 Herbstreith & Fox KG, Neuenbürg, Labor für Forschung
und Entwicklung, Werkstudentin

Universitäres Engagement (Universität Hohenheim)

03/02 – 06/04	Mitglied in der Fachschaft Ernährungswissenschaft/ Lebensmitteltechnologie
10/02 – 06/04	Mitglied im Fakultätsrat der Fakultät Naturwissenschaften
01/10/02 – 15/06/04	Mitglied in der Studienkommission Ernährungswissenschaft
01/10/02 – 30/09/03	Mitglied im Prüfungsausschuss Ernährungswissenschaft
11/2002 – 15/06/2004	Mitglied in der Berufungskommission „Biofunktionalität und Sicherheit von Lebensmittel/ C3“,
10/2003 – 15/06/2004	Mitglied in der Berufungskommission „Ernährungsmedizin/ Prävention/ C4“,

Publikationen

03/12/07	Grempler R., <u>Leicht S.</u> , Kischel I., Eickelmann P., Redemann N. (2007), Inhibition of SH2-domain containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) in insulin producing INS1E cells improves insulin signal transduction and induces proliferation. FEBS Lett, 581(30):5885-5890
06/11/05 – 09/11/05	Posterpräsentation beim Biological Meeting von Boehringer- Ingelheim in Bad Aibling, „Cloning and functional characterization of new SGLT- genes“
19/09/06 – 21/09/06	Posterpräsentation beim EASD in Kopenhagen „Cloning and functional characterization of new SGLT- genes“
05/10/06	Posterpräsentation beim GRK1041 Symposium 2006 der Universität Ulm „Regulation of peptide hormone release in neuroendocrine cells in the gut and pancreas“
17/09/07 – 21/09/07	Posterpräsentation beim EASD in Amsterdam „Role of GPCR signaling in peptide hormone release in neuroendocrine cells in the gut and the pancreas“