

***Damit das Mögliche entsteht,  
muss immer wieder das Unmögliche versucht werden.***

(Hermann Hesse)

**Stimulus-Sekretions-Kopplung  
pankreatischer B-Zellen  
aus SUR1<sup>-/-</sup> Mäusen**

**Dissertation**

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**2006**

**vorgelegt von**

**Dirk Haspel**

Tag der mündlichen Prüfung:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

26. Januar 2006

Prof. Dr. S. Laufer

Prof. Dr. G. Drews

Prof. Dr. P. Ruth

*Für Silke*

*die ich über alles liebe  
und die mich durch alle Höhen und Tiefen  
dieser Arbeit begleitet hat*

Während der Dissertation sind die folgenden Veröffentlichungen erschienen:

### **Originalpublikationen**

Düfer M, Haspel D, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G (2004)  
Oscillations of membrane potential and cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in SUR1<sup>-/-</sup> beta cells. *Diabetologia* 47: 488-498

Haspel D, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G, Düfer M (2005)  
Crosstalk between membrane potential and cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in beta cells from Sur1<sup>-/-</sup> mice *Diabetologia* 48: 913-921

### **Kongressbeiträge**

Düfer M, Haspel D, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G (2003)  
B-cells from SUR1<sup>-/-</sup> mice exhibit slow waves of membrane potential. *Diabetologia* 46 Suppl 2: A161, 458

Haspel D, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G, Düfer M (2004)  
Membrane potential oscillations in SUR1KO mouse pancreatic  $\beta$ -cells measured with microelectrodes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369 Suppl 1: R66, 261

Krippeit-Drews P, Haspel D, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Düfer M, Drews G (2004)  
Oscillations in membrane potential in pancreatic B-cells of SUR1<sup>-/-</sup> mouse. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 447 Suppl 1: S43, O16-5

Düfer M, Haspel D, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G (2004)  
Kopplung von Membranpotential und cytosolischer  $Ca^{2+}$ -Konzentration in  $K_{ATP}$ -Kanal defizienten B-Zellen des Pankreas. *Diabetes und Stoffwechsel* 13 Suppl 1: P113

Haspel D, Düfer M, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G (2005)  
Interaction of membrane potential and intracellular free calcium concentration in beta-cells of SUR1<sup>-/-</sup> mice. *Diabetologia* 47 Suppl 1: A154, 413

Krippeit-Drews P, Haspel D, Düfer M, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G (2005)  
Mitochondrial calcium storage in pancreatic B-cells of SUR1KO mice. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 449 Suppl 1: S116, P16-15

Düfer M, Haspel D, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G (2005)  
Contribution of mitochondria to calcium storage in SUR1 KO mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371 Suppl 1: R59, 250

Haspel D, Düfer M, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G (2005)  
Mitochondrial storage of calcium in SUR1 KO mice. *Vortrag 8. Inselworkshop Goslar*

**INHALT**

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Glucosestoffwechsel.....	1
1.2 Die Langerhans-Inseln.....	1
1.2.1 Die Bildung von Insulin und seine Speicherung.....	2
1.3 Insulinsekretion.....	3
1.3.1 Grundlagen der Insulinsekretion.....	3
1.3.2 Initiatoren der Insulinsekretion.....	3
1.3.3 Modulatoren der Insulinsekretion.....	4
1.3.3.1 Fördernde Modulatoren.....	4
1.3.3.2 Hemmende Modulatoren.....	5
1.4 Glycolyse und ATP-Bildung.....	6
1.5 Stimulus-Sekretions-Kopplung der B-Zelle.....	9
1.5.1 Grundlagen.....	9
1.5.2 Die elektrische Aktivität der B-Zelle.....	10
1.5.3 Beziehung zwischen extrazellulärer Glucosekonzentration und intrazellulärer Calciumkonzentration der B-Zelle.....	13
1.5.4 Oszillationen in B-Zellen.....	14
1.6 Ionenkanäle und ihre Bedeutung für die B-Zelle.....	18
1.6.1 Der ATP-abhängige Kaliumkanal.....	18
1.6.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle.....	22
1.6.3 Calciumabhängige Kaliumkanäle.....	23
1.6.4 Spannungsabhängige Calciumkanäle.....	25
1.7 Störungen der Insulinsekretion.....	28
1.7.1 Diabetes.....	28
1.7.2 Hyperinsulinismus.....	30
1.8 $K_{ATP}$ -Kanal-defiziente Mäuse.....	32
1.9 Fragestellung.....	34
<b>2 MATERIAL.....</b>	<b>36</b>

<b>2.1</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>36</b>
2.2.1	Zellkultur.....	36
2.2.2	Messsystem für Calcium-Imaging .....	36
2.2.3	Mikroelektrodenmesssystem.....	37
<b>2.3</b>	<b>Chemikalien.....</b>	<b>38</b>
<b>2.4</b>	<b>Lösungen.....</b>	<b>39</b>
2.4.1	Präparierlösungen zur Isolierung der Langerhans-Inseln aus Mäusepankreas .....	39
2.4.2	Medium für B-Zell Kultur.....	39
2.4.3	Lösungen für Mikroelektrodenversuche .....	40
2.4.3.1	Badlösung .....	40
2.4.3.2	Lösung für die Mikroelektrode .....	40
2.4.4	Badlösung für $[Ca]_c$ -Messungen .....	40
2.4.5	Lösungen für die Bestimmung der Insulinsekretion aus Langerhansinseln .....	41
2.4.5.1	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer .....	41
2.4.5.2	Lösung für den Radioimmunoassay (RIA) .....	41
2.4.5.3	Ratteninsulinstandard.....	42
2.4.5.4	Radioaktiv markiertes Jod.....	42
2.4.6	Stammlösungen .....	43
2.4.7	Weitere Lösungen .....	43
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Präparation von Langerhans-Inseln aus Mäusen und Gewinnung von Einzelzellen zur Bestimmung von <math>[Ca]_c</math>.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>Fluoreszenzoptische Messung von <math>[Ca]_c</math>.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>Steady-state-Inkubation zur Bestimmung der Insulinsekretion aus Langerhans-Inseln ....</b>	<b>46</b>
<b>3.4</b>	<b>Radioimmunoassay (RIA) zur Insulinbestimmung.....</b>	<b>46</b>
<b>3.5</b>	<b>Mikroelektrodentchnik.....</b>	<b>47</b>
3.5.1	Präparation einzelner Langerhans-Inseln zur Ableitung des Membranpotentials mit der Mikroelektrode.....	47
3.5.2	Aufbau der Messapparatur .....	47
3.5.2.1	Perifusionsanlage .....	49
3.5.2.2	Elektroden .....	50
3.5.2.3	Messgeräte und Datensicherung.....	51
3.5.3	Versuchsdurchführung.....	51

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>54</b>
4.1	Untersuchungen zur Glucoseabhängigkeit des Membranpotentials in SUR1 <sup>-/-</sup> B-Zellen ....	54
4.2	Einfluß von K <sub>ATP</sub> -Kanal sensitiven Pharmaka auf das Membranpotential in SUR1 <sup>-/-</sup> B-Zellen .....	58
4.3	Untersuchung zur Kopplung von Membranpotential, intrazellulärer Calciumkonzentration und Insulinsekretion .....	59
4.4	Beeinflussung des Membranpotentials durch Veränderung der extrazellulären Calciumkonzentration .....	66
4.5	Veränderungen in V <sub>m</sub> , [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> und Insulinsekretion, durch Beeinflussung intrazellulärer Calciumspeicher in B-Zellen aus SUR1 <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	68
4.5.1	Veränderungen in V <sub>m</sub> durch Hemmung der Calciumspeicherung in das ER .....	68
4.5.2	Einfluss von CPA auf [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> und Insulinsekretion in SUR1 <sup>-/-</sup> B-Zellen .....	69
4.5.3	Untersuchungen zum speicherinduzierten Calciumeinstrom in SUR1 <sup>-/-</sup> B-Zellen .....	72
4.6	Untersuchungen zum „transient drop“ in SUR1 <sup>-/-</sup> B-Zellen .....	74
4.6.1	Glucoseinduzierte transiente Abnahme von [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> in WT B-Zellen.....	74
4.6.2	Transiente Abnahme der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration als Folge von gesteigertem Glucosemetabolismus in SUR1 <sup>-/-</sup> B-Zellen .....	75
4.6.3	Unterbrechung der ATP-Produktion in den Mitochondrien verhindert den transient drop in SUR1 <sup>-/-</sup> B-Zellen .....	77
4.6.4	Transiente Hyperpolarisation in V <sub>m</sub> durch gesteigerten Glucosemetabolismus .....	81
4.6.5	Untersuchung zur Beteiligung der K <sub>v</sub> -Kanäle beim transient drop .....	82
4.6.6	Hemmung der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase verhindert die transiente Hyperpolarisation in SUR1 <sup>-/-</sup> B-Zellen... ..	85
4.7	Hemmung des K <sub>ATP</sub> -Kanals bzw. Knockout der SUR1-UE führt zu veränderter Calciumspeicherung in B-Zellen.....	90
4.7.1	Calciumspeicherung in WT B-Zellen.....	90
4.7.2	Calciumspeicherung in SUR1 <sup>-/-</sup> B-Zellen.....	91
4.7.3	Veränderte Calciumspeicherung in WT B-Zellen durch Tolbutamid .....	92
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>96</b>
5.1	Insulinsekretion in SUR1 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	96
5.2	Regulation von V <sub>m</sub> und Stimulus-Sekretions-Kopplung in B-Zellen aus SUR1 <sup>-/-</sup> Mäusen ..	97
5.3	Der transient drop.....	103

5.4	Veränderte Calciumspeicherung in SUR1 <sup>-/-</sup> B-Zellen .....	107
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	111
7	AUSBLICK.....	112
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	114
9	DANKSAGUNG .....	144

## Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\Psi$	mitochondrielles Membranpotential
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve = Fläche unter der Kurve
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium
$[\text{Ca}^{2+}]_c$	freie intrazelluläre Calciumkonzentration
$[\text{Ca}^{2+}]_m$	Calciumkonzentration der Mitochondrien
CCK	Cholecystokinin
D600	Gallopamil
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
$\text{FADH}_2$	Flavin-adenin-dinucleotid reduzierte Form
FCCP	Carbonyl-cyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
Fura-2/AM	Fura-2 Acetoxymethylester
FOPP	Fraction of plateau phase = prozentualer Anteil der depolarisierten Phasen des Membranpotentials mit Spikeaktivität
G	Glucose
GIP	glucose-dependent insulin-releasing peptide
GLP-1	glucagon-like peptide-1
GRP	gastrin-releasing polypeptide
$\text{IP}_3$	Inositol-1,4,5-triphosphat
$\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal	ATP-abhängiger Kaliumkanal
$\text{K}(\text{Ca}^{2+})$	Calciumabhängiger Kaliumkanal
$\text{K}_{\text{ir}}$	einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal
$\text{K}_{\text{ir}6.2}^{-/-}$	Knockout der $\text{K}_{\text{ir}6.2}$ Untereinheit des einwärts-gleichrichtenden Kaliumkanal
KO	Knockout

KRH	Krebs-Ringer-HEPES
K <sub>v</sub>	Spannungsabhängiger Kaliumkanal
mitoK <sub>ATP</sub> -Kanal	K <sub>ATP</sub> -Kanal der Mitochondrien
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid reduzierte Form
NBD	Nucleotide binding domain – Nukleotidbindende Domäne
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphat
PTP	permeability transition pore
UE	Untereinheit
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des endoplasmatischen Retikulums
SNAP	soluble NSF attachment protein
SNARE	SNAP-Rezeptor
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
SUR1 <sup>-/-</sup>	Knockout des Sulfonylharnstoffrezeptor 1
TMD	Transmembranäre Domäne
V <sub>m</sub>	Plasmamembranpotential
VIP	Vasoactive intestinal polypeptide
WT	Wild-Typ (C57/Bl6-Mäuse)

# 1 Einleitung

## 1.1 Glucosestoffwechsel

Eine genaue Regulation der Blutzuckerkonzentration ist für den Organismus unerlässlich. Alle Organe des Körpers nutzen Glucose als Energielieferanten, wobei Gehirn und Erythrozyten praktisch ausschließlich Glucose als Substrat nutzen und damit auf Störungen des Glucosestoffwechsels besonders kritisch reagieren. Der Nüchternwert der Blutglucosekonzentration liegt zwischen 3,5 mM und 5,5 mM. Nach dem Essen steigt der Wert üblicherweise bis 7,7 mM an. Übersteigt der Wert die Grenze von 9,7 mM - 10 mM (Hyperglykämie), schaffen es die Nieren nicht mehr sämtliche Glucose aus dem Primärharn zurück zu resorbieren (alle Transporter sind besetzt), so dass Glucose auch im Urin nachweisbar wird. Dabei weist jedoch die Nierenschwelle starke interindividuelle Schwankungen auf. Bei einer akuten Hypoglykämie mit Konzentrationen unter 3,3 mM sind bereits neurologische Ausfälle zu beobachten.

Um die Blutzuckerkonzentration konstant zu halten, stehen dem Organismus blutzuckerregulierende Hormone zur Verfügung. So senkt die Ausschüttung von Insulin die Blutzuckerkonzentration durch verstärkte Glucoseaufnahme in die Zielorgane (Leber und Skelettmuskulatur), während Glucagon, Cortisol und Adrenalin die Glycolyse und/oder die Gluconeogenese stimulieren und somit zu einer Erhöhung der Blutzuckerkonzentration führen.

Eine verminderte Ausschüttung von Insulin oder eine ungenügende Wirkung von vorhandenem Insulin an seinen Zielorganen führt zu Diabetes mellitus. Charakteristisch für alle Formen des Diabetes mellitus ist eine dauerhaft erhöhte Blutzuckerkonzentration. Zu hohe Insulinkonzentrationen, wie sie beim Hyperinsulinismus vorkommen, senken die Blutzuckerkonzentration dramatisch ab und führen zu Zittern, Schweißausbruch, Blässe, Apathie, Krampfanfällen und Apnoe bis hin zum Koma.

## 1.2 Die Langerhans-Inseln

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas), die für die Insulinsekretion verantwortlich ist, besteht zu 99% aus exokrinem Gewebe, in dem Verdauungsenzyme gebildet werden und zu 1% aus den Langerhans-Inseln (Hedeskov 1980). Diese tragen ihren Namen nach ihrem Entdecker Paul Langerhans (1847-1888). Langerhans beschrieb 1869

charakteristische Zell-Inseln innerhalb des exokrinen Gewebes der Bauchspeicheldrüse in seiner Inaugural-Dissertation „Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse“.

Etwa eine Million Langerhans-Inseln sind unregelmäßig im exokrinen Teil eingebettet und bilden den endokrinen Teil des Gewebes. Jede Insel besteht aus etwa 1000 Zellen (Hellman et al. 1964), wobei man vier verschiedene Zell-Typen identifiziert hat, die jeweils unterschiedliche Hormone produzieren und die in A-, B-, D- und PP-Zellen unterschieden werden. A-Zellen finden sich in der Peripherie und produzieren Glucagon. Sie machen 15-20% der Inselzellmasse aus. Die Insulin produzierenden B-Zellen bilden mit 65-90% den Hauptanteil der Langerhans-Inseln und finden sich hauptsächlich im Inneren der Insel. Somatostatin-produzierende D-Zellen kommen weitaus seltener vor (3-10%) und PP-Zellen, welche pankreatisches Polypeptid ausschütten (Ashcroft und Gribble 1989), das die Sekretion des exokrinen Pankreas hemmt, sind nur zu ca. 1% vertreten.

Alle Zelltypen beeinflussen sich über parakrine Effekte gegenseitig in ihrer Sekretion. Da die B-Zellen im Inselinneren liegen und das Insulin über die Kapillaren nach außen transportiert wird, erreicht es sehr schnell die in der Peripherie liegenden A-Zellen und wirkt hemmend auf deren Glucagon-Produktion.

### **1.2.1 Die Bildung von Insulin und seine Speicherung**

Insulin wird in den B-Zellen der Langerhans-Inseln gebildet und gespeichert. Bereits 1921 gelang es dem kanadischen Arzt Frederick Grant Banting (1891-1941) und einem seiner Studenten Charles Best (1899-1978) aus Bauchspeicheldrüsen toter Hunde und ungeborener Kälber einen Extrakt zu isolieren, den sie für Insulin hielten. Die intravenöse Applikation dieses Extraktes führte bei einem pankreatektomierten Hund zur Blutzuckersenkung. Insulin war das erste Hormon, dessen Sequenz vollständig aufgeklärt wurde (Sanger et al. 1955).

Das Insulin-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 11. Sein Gen kodiert für das 104 Aminosäuren lange Präproinsulin. Die mRNA des Präproinsulins besitzt eine Signalsequenz, die dafür sorgt, dass es an der richtigen Stelle ins Innere des ER transportiert wird. Im ER wird dann diese Signalsequenz abgetrennt und es entsteht das Proinsulin (Steiner et al. 1985). Dieses Proinsulin ist die einkettige Vorstufe des Insulin. Durch enzymatische Abspaltung des 31 Aminosäuren langen C-Peptid im Golgi-Apparat, welches die A- und B-Kette des Proinsulins verbindet, entsteht das Insulin. Die A-Kette

besteht aus 21 und die B-Kette aus 30 Aminosäuren. Die Ketten sind über zwei Disulfidbrücken an Cysteinresten miteinander verbunden. Eine dritte raumstabilisierende Disulfidbrücke findet sich noch innerhalb der A-Kette. Durch Abschnürung aus dem Golgi-Apparat wird Insulin in Vesikeln gespeichert. Es dimerisiert in Lösung durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und bildet Hexamere in Anwesenheit von Zink.

Eine Glucoseaufnahme in die B-Zelle und deren Metabolisierung führt neben anderen Stimuli zu einer Sekretion von Insulin (Hedeskov 1980).

## **1.3 Insulinsekretion**

### **1.3.1 Grundlagen der Insulinsekretion**

Als Signal für die Insulinsekretion der B-Zelle, dient der Calciumeinstrom durch L-Typ-  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle über die Plasmamembran. Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist das Triggersignal für das Verschmelzen der insulinhaltigen Vesikel mit der Plasmamembran und damit der Freisetzung von Insulin (Dean 1973).

Am perfundierten Rattenpankreas konnte gezeigt werden, dass die Insulinsekretion, nach raschem Erhöhen der Glucosekonzentration, biphasisch verläuft (Curry et al. 1968): Nach wenigen Minuten wird ein Gipfel erreicht, dem sich nach kurzem Absinken eine längere zweite Phase mit anhaltender Insulinsekretion anschließt.

Die erste Phase wird durch die rasche Konzentrationsänderung der Glucose hervorgerufen. Das Ausmaß der ersten Phase hängt von der Steigerungsrate der Glucose ab, während die zweite Phase von der Höhe der Glucosekonzentration abhängt (Hedeskov 1980).

### **1.3.2 Initiatoren der Insulinsekretion**

Substanzen, die die Insulinsekretion stimulieren, können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Initiatoren und Modulatoren.

Als Initiatoren bezeichnet man Substanzen, die direkt eine Insulinsekretion auslösen können. Hierzu zählen verschiedene Monosaccharide wie Glucose, Fructose und Mannose. Weiterhin Glycerinaldehyd als Zwischenprodukt der Glykolyse und einige

Aminosäuren: Arginin, Lysin und Leucin sowie alpha-Ketoisocapronsäure als Deaminierungsprodukt des Leucins.

Auch Arzneistoffe, zum Beispiel die Sulfonylharnstoffe, stimulieren die Insulinsekretion. Diese wirken direkt an den  $K_{ATP}$ -Kanälen, während Nährstoffe erst noch metabolisiert werden müssen. (Ashcroft und Gribble 1999).

### **1.3.3 Modulatoren der Insulinsekretion**

Als Modulatoren der Insulinsekretion bezeichnet man alle Substanzen, die in der Lage sind die Insulinsekretion zu verstärken oder abzuschwächen, aber nicht direkt auszulösen.

Die Modulation erfolgt hauptsächlich über Phosphorylierungsvorgänge, bei denen die Proteinkinase A, die Proteinkinase C und verschiedene Phosphatasen beteiligt sind.

#### **1.3.3.1 Fördernde Modulatoren**

Zu den sekretionssteigernden Modulatoren zählt man Acetylcholin, den Neurotransmitter des Parasympathikus. Acetylcholin stimuliert über muskarinische ( $M_3$ ) Rezeptoren, die  $G_q$ -Protein gekoppelt sind, die Phospholipase C (Henquin und Nenquin 1988, Zawalich und Rasmussen 1990). Die Phospholipase C spaltet membranständiges  $PIP_2$  in  $IP_3$  und DAG.  $IP_3$  erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration der B-Zellen, indem es aus intrazellulären Speichern (z.B. aus dem endoplasmatischen Retikulum) Calcium freisetzt. Somit wird die durch andere Substanzen ausgelöste Insulinsekretion verstärkt (Gagerman et al. 1978, Wollheim et al. 1980, Henquin et al. 1988). DAG aktiviert die Proteinkinase C (Arkhammer et al. 1994). Diese erhöht die Calciumempfindlichkeit des Sekretionsapparates und führt zu einer verstärkten Offenwahrscheinlichkeit der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle (Ashcroft et al. 1994).

Oral aufgenommene Glucose führt zu einer deutlich höheren Insulinsekretion als eine vergleichbare Menge parenteral applizierte Glucose. (Ebert und Creutzfeldt 1987).

Verantwortlich für diesen Effekt sind Inkretine. Die Inkretinhormone GLP-1, CCK und GIP werden aus endokrinen Zellen des distalen Ileum und des Kolon nach erfolgter Nahrungsaufnahme freigesetzt (Drucker 2001, Kieffer 2004, Scrocchi et al. 1996).

GLP-1 (Ørskov 1992), GIP (Ebert und Creutzfeldt 1987) und CCK (Zawalich et al. 1987) verstärken die Insulinsekretion der B-Zellen. GIP, GLP-1 und Glucagon, das

Hormon der A-Zellen, erhöhen über die Aktivierung der Adenylatcyclase die cAMP-Konzentration der B-Zelle (Schuit und Pipeleers 1985, Thorens und Waeber 1993) und aktivieren dadurch die Proteinkinase A (Malaisse und Malaisse-Lagae 1984).

Es ist anzunehmen, dass hierbei die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle phosphoryliert werden, so dass sich die Offenwahrscheinlichkeit dieser Kanäle erhöht (Ämmälä et al 1993a, Safayhi et al. 1997), bzw. die Inaktivierung sich verzögert. (Ämmälä et al 1993a, Britsch et al. 1995). Hierdurch strömt mehr Calcium ein und die Sekretion wird gesteigert (Henquin und Meissner 1984a).

Für die Steigerung der Insulinsekretion durch CCK wird die Aktivierung über die PLC postuliert (Prentki und Matschinsky 1987, Verspohl und Hermann 1996). Die Neuropeptide GRP (Wahl 1994) und VIP (Ebert und Creutzfeldt 1987, Zawalich et al. 1987, Wahl 1994) sind ebenfalls sekundäre Stimuli der Insulinsekretion.

### **1.3.3.2 Hemmende Modulatoren**

Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, sowie ein aus sympathischen Neuronen sezerniertes Peptid, Galanin und das in den D-Zellen gebildete Somatostatin haben einen hemmenden Einfluss auf die Insulinsekretion (Robertson et al. 1991).

Die Substanzen hyperpolarisieren die B-Zelle und hemmen so transient den Calciumeinstrom (Pace 1980, Cook und Perara 1982, Nilsson et al. 1988, Drews et al. 1990).

Rabinovitch et al. (1978) schlagen eine Hemmung der Adenylatcyclase und dadurch verminderte cAMP-Spiegel als Hemmmechanismus vor. Denkbar wäre auch die Aktivierung eines hyperpolarisierenden Kaliumstromes (Drews et al. 1990, Rorsman et al 1991, Sieg et al. 2004), wobei es sich hierbei jedoch nicht um den  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Strom handeln kann (Düfer et al. 2004, Sieg et al. 2004). Adrenalin und Galanin hemmen zusätzlich den Exozytoseprozess (Jones et al. 1987, Ullrich und Wollheim 1988, 1989).

## 1.4 Glycolyse und ATP-Bildung

Im Jahre 1905 beobachteten A. Harden und W. Young, dass der Glucoseabbau zum Erliegen kommt, falls nicht ausreichende Mengen an anorganischem Phosphat angeboten werden. Dieses wird dazu benötigt, Zucker zu phosphorylieren. Sie isolierten ein Hexosediphosphat, das später als Fructose-1,6-diphosphat identifiziert wurde und zeigten, dass es sich dabei um ein Zwischenprodukt des Glucoseabbaus handelt. Der Abbauweg wurde in den Jahren bis 1940 restlos aufgeklärt. Hierbei leisteten die Biochemiker G. Embden, O. Meyerhoff, C. Neuber, J. Parnass, O. Warburg, G. und C. Cori entscheidende Arbeit, so dass die Glykolyse auch unter der Bezeichnung Embden-Meyerhoff-Parnass-Schema in die Literatur eingegangen ist. Die Reaktionsschritte sind wie folgt zusammenzufassen: Glucose wird durch die Hexokinasen I-III (phosphoryliert auch andere Hexosen) und die Glucokinase (Hexokinase IV) zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. Die Hexokinasen I-III binden Glucose mit hoher Affinität ( $K_m$ : 0,01 mM). Damit ist gewährleistet, dass unabhängig der Stoffwechsellage, Muskel- oder Hirnzellen Glucose aus dem Blut in die Glycolyse einschleusen können. Die Glucokinase, die sich in Leber- und pankreatischen B-Zellen befindet, weist eine geringere Affinität auf. Ihr  $K_m$  liegt im physiologischen Bereich der Blutzuckerkonzentration (10 mM; Lenzen und Panten 1988). Die Hexokinasen I-III arbeiten bei physiologischer Glucosekonzentration im Sättigungsbereich und sind durch ihr Produkt hemmbar. Sie spielen für die Phosphorylierung der Glucose keine Rolle (German 1993). In den B-Zellen wird daher Glucose ausschliesslich durch die Glucokinase phosphoryliert. Gleichzeitig stellt die Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glycolyse dar (Lenzen und Panten 1988). Aus diesem Grund wird die Glucokinase allgemein als Glucosesensor angesehen, welcher den glycolytischen Fluss reguliert (Matschinsky et al. 1993).

Glucose-6-phosphat wird dann über Fructose-6-phosphat (Isomerisierung) und Fructose-1,6-diphosphat (unter ATP-Verbrauch) zum Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat (Aldolasenspaltung) umgesetzt.

Nun erfolgt die Oxidation des Glycerinaldehyd-3-phosphat zum 3-Phosphoglycerolphosphat. Dabei entsteht aus  $\text{NAD}^+$  pro C3-Körper ein Molekül NADH. 3-Phosphoglycerolphosphat wird in weiteren Schritten bis zum Pyruvat abgebaut. Ein Mangel an Lactatdehydrogenase in B-Zellen verhindert die weitere Umsetzung zu Lactat (Sekine et al. 1994).

Pyruvat wird über einen Pyruvat/ $H^+$ -Symporter in die Mitochondrien eingeschleust und dient dort als Substrat für den Citratzyklus. Dabei werden weitere Reduktionsäquivalente in Form von NADH und  $FADH_2$  gebildet.

Obwohl Glucose in B-Zellen vollständig zu Pyruvat abgebaut wird, ist Pyruvat kein Stimulus der Insulinsekretion (Sener et al. 1978; Mac Donald 1990; Mertz et al. 1996; Düfer et al. 2002a), da es weder die elektrische Aktivität der B-Zelle verstärkt (Mertz et al. 1996, Düfer et al. 2002a) noch  $[Ca^{2+}]_c$  erhöht (Lembert et al. 2001, Düfer et al. 2002a). Des Weiteren wurde gezeigt, dass sowohl eine Hemmung des Pyruvat-Transportes in die Mitochondrien als auch die Hemmung des Citratzykluses keinen Einfluss auf den  $K_{ATP}$ -Strom bzw.  $[Ca^{2+}]_c$  haben (Dukes et al. 1994). Somit spielen die durch Pyruvatabbau im Citratzyklus gebildeten Reduktionsäquivalente für die Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten, der zum Schließen der  $K_{ATP}$ -Kanäle und damit zur Insulinsekretion führt, eine untergeordnete Rolle.

Das über Pyruvatabbau gebildete ATP wird von den B-Zellen wahrscheinlich für andere ATP-verbrauchende Prozesse (z.B. ATPasen) verwendet. Die in der Glycolyse gebildeten Reduktionsäquivalente gelangen über zwei Wege in die Mitochondrien: über den Glycerinphosphat-Shuttle (MacDonald 1981) und über den Malat-Aspartat-Shuttle (MacDonald 1982).

Eto et al. (1999) konnten anhand von Knock-Out-Mäusen zeigen, dass bei gehemmten bzw. ausgeschalteten Shuttle-Systemen die glucoseinduzierte Insulinsekretion zum Erliegen kommt. Damit wurde deutlich gezeigt, dass nur das ATP, das in der Atmungskette aus den Reduktionsäquivalenten der Glycolyse gebildet wird, für die Insulinsekretion der B-Zelle von Bedeutung ist. Die Reduktionsäquivalente werden an der inneren Mitochondrienmembran oxidativ phosphoryliert. Dabei entsteht pro Mol NADH 2,5 Mol ATP.

Mitochondrien besitzen eine innere und eine äußere Membran sowie die Matrix im Inneren. An der inneren Mitochondrienmembran findet die ATP-Produktion der Zelle statt. In dem Raum zwischen den beiden Membranen - dem Membranzwischenraum - herrscht normalerweise eine hohe Konzentration an Protonen. Im Inneren des Mitochondriums, in der Matrix, herrscht dagegen eine niedrige Konzentration.

Die Protonen diffundieren entlang des Konzentrationsgefälles ins Innere. Dabei passieren sie einen Enzymkomplex, die ATP-Synthase. Hier wird aus ADP und energiereichem Phosphat ATP gebildet.

Damit das Protonengefälle nicht zum Erliegen kommt, müssen die Protonen wieder in den Membranzwischenraum gepumpt werden. Die dazu erforderliche Energie stammt

aus einer exothermen chemischen Reaktion, bei der  $\text{NADH}/\text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  unter Sauerstoffverbrauch oxidiert werden. Es werden dabei zwei Protonen und zwei Elektronen vom  $\text{NADH}/\text{H}^+$  auf den Sauerstoff übertragen. Dies geschieht in mehreren Teilschritten, der so genannten Elektronentransportkette.

Die oxidative Phosphorylierung oder auch Atmungskettenphosphorylierung genannt, lebt also von dem Aufbau und der Nutzbarmachung dieses Protonengradienten. Sie sind eng miteinander gekoppelt. Man spricht auch von chemiosmotischer Kopplung.

## 1.5 Stimulus-Sekretions-Kopplung der B-Zelle

### 1.5.1 Grundlagen

Die Stimulus-Sekretions-Kopplung beschreibt den Zusammenhang zwischen Glucosemetabolismus, elektrischer Erregbarkeit und Insulinsekretion der B-Zelle. Sie ist schematisch in Abbildung 1.1 dargestellt. Erhöht sich die Glucosekonzentration im Blut, so wird Glucose mittels des insulinunabhängigen GLUT-2 (Glucose-Transporter 2) in die B-Zelle aufgenommen.

Durch seine hohe Transportkapazität ( $K_m > 40$  mM) stellt die Glucoseaufnahme in die Zelle keinen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Thorens et al. 1988, Johnson et al. 1990).

Glucose wird in der Glycolyse metabolisiert. Die daraus resultierenden Reduktionsäquivalente führen zu einer Steigerung der ATP-Synthese. Dadurch erhöht sich der ATP/ADP-Quotient und es kommt zum Schließen ATP-abhängiger Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle).

Die Kaliumleitfähigkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle vermindert sich dabei mit steigender Glucosekonzentration. Die Zelle depolarisiert durch den abnehmenden hyperpolarisierenden Kaliumausstrom, da nun ein bislang unbekannter depolarisierender Strom in den Vordergrund tritt. Erreicht die Zelle das Schwellenpotential der spannungsabhängigen Calciumkanäle, so kommt es zum Öffnen der Kanäle und damit zum Calciumeinstrom in die B-Zelle (Plant 1988a, Rosario et al. 1993).

Ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ist notwendig für die Insulinsekretion (Wollheim und Sharp 1981, Prentki und Matschinsky 1987). Hierbei interagieren v-SNARE-Proteine der Vesikelmembran mit t-SNARE-Proteinen (Syntaxin-1 und SNAP-25) der Plasmamembran und bilden, unter ATP-Verbrauch, den so genannten SNARE-Komplex. Ein weiteres mit der Vesikelmembran assoziiertes Protein – Synaptotagmin - aktiviert die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran. Hierfür besitzt es zwei Calciumbindungsstellen.

Nach Calciumbindung interagiert es mit dem SNARE-Komplex und membranständigem  $PIP_2$ . Dadurch kommt es zur Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran und Insulin wird ausgeschüttet. Die Expression von Syntaxin-1 und SNAP-25 in pankreatischen B-Zellen wurde nachgewiesen (Jacobsson et al. 1994,

Wheeler et al. 1996, Nagamatsu et al. 1996), ebenso ihre Funktion bei der Exozytose von Insulin (Sadoul et al. 1995, Martin et al. 1995, Kiraly-Borri et al. 1996, Nagamatsu et al. 1999).

Iezzi et al. (2005) zeigten, dass Langerhans-Inseln, bei denen die Expression von Synaptotagmin-9 durch siRNA unterdrückt wird, keine glucoseinduzierte Insulinsekretion mehr haben. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Isoform als Calciumsensor für die Insulinexozytose der B-Zellen dient.

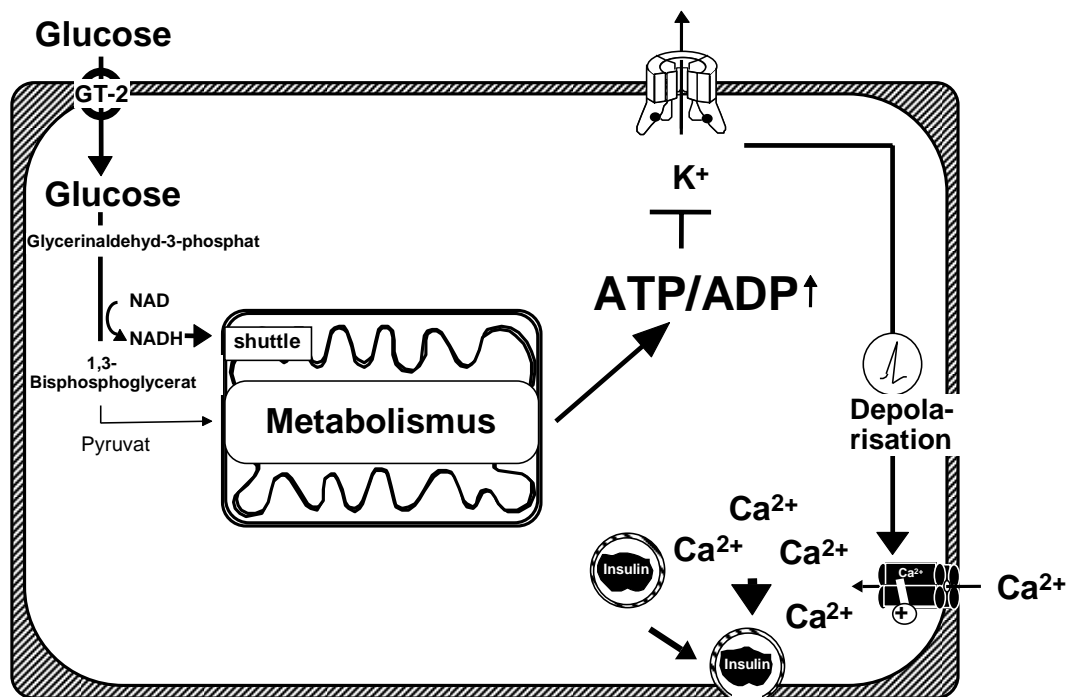


Abb. 1.1 Schematischer Ablauf der Stimulus-Sekretionskopplung in B-Zellen der Langerhans-Inseln (nach Prof. Krippeit-Drews).

### 1.5.2 Die elektrische Aktivität der B-Zelle

Für die Stimulus-Sekretions-Kopplung der B-Zelle ist deren elektrische Erregbarkeit essentiell. Lange Zeit galten nur Nerven- und Muskelzellen, nicht jedoch endokrine Zellen als elektrisch erregbar. Dean und Matthews konnten 1968 erstmals zeigen, dass murine B-Zellen, eingebettet in ihren funktionellen Verband (die Langerhans-Insel), durch Stimulation mit Glucose elektrisch erregbar sind. Heute weiß man, dass die elektrische Erregbarkeit das entscheidende Bindeglied für die Umsetzung des metabolischen Glucosesignals in die Insulinsekretion ist.

Die elektrische Erregbarkeit der B-Zellen wurde im Laufe der Jahre auch an anderen Spezies wie Ratte, Hund und Mensch gezeigt. Die durch Glucose ausgelösten Aktionspotentiale sind in B-Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktionspotentiale. Für die Maus gilt dies ausschließlich (Plant 1988a, Plant 1988b, Rosario et al. 1993), da Natriumkanäle in murinen B-Zellen bereits beim Ruhemembranpotential inaktiviert sind. Außerdem sind die durch Glucose ausgelösten Aktionspotentiale gegenüber Tetrodotoxin, einem Blocker für spannungsabhängige Natriumkanäle, insensitive (Plant 1988b). Bei Hund und Mensch, sind  $\text{Na}^+$ -Aktionspotentiale, unter physiologischen Bedingungen, neben den  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktionspotentialen, möglicherweise an der Ausbildung glucoseinduzierter Aktionspotentiale beteiligt (Pressel und Mislner 1991, Barnett et al. 1995).

Eine Beteiligung der  $\text{Na}^+$ -Aktionspotentiale an der elektrischen Erregbarkeit der Ratten B-Zellen und deren physiologischen Funktion ist noch nicht abschließend geklärt (Hiriart und Matteson 1988, Lou et al. 2003).

Bei Glucosekonzentrationen von 0-3 mM ist die B-Zelle elektrisch inaktiv. Ihr Ruhemembranpotential liegt bei ungefähr  $-70$  mV und wird fast ausschließlich durch den Kaliumausstrom durch  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle gebildet (Ashcroft und Rorsman 1989). Es liegt daher nahe am Gleichgewichtspotential für Kalium von  $-90$  mV.

Jean Claude Henquin konnte 1978 zeigen, dass durch Erhöhen der Glucosekonzentration, der Kaliumstrom verringert wird. Diese Abnahme im Kaliumstrom kommt durch gesteigerten Glucosemetabolismus zustande (Rorsman und Trube 1985), wodurch sich der ATP/ADP-Quotient erhöht (Malaisse und Sener 1987), der zu einer Hemmung der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle führt. Die  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit nimmt ab und die B-Zelle beginnt zu depolarisieren, da nun ein bislang noch unbekannter depolarisierender Strom der abnehmenden  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit entgegenwirkt.

Mit steigender Glucosekonzentration schließen immer mehr  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle und die Zelle erreicht das Schwellenpotential von ca.  $-50$  mV. Dies entspricht einer extrazellulären Glucosekonzentration von ungefähr 5-7 mM (Meissner und Schmelz 1974). Nun öffnen spannungsabhängige L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und Calcium strömt in die Zelle ein (Satin und Cook 1985), es kommt zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktionspotentialen. Zunächst treten diese vereinzelt auf, um bei steigender Glucosekonzentration in ein typisches Muster elektrischer Aktivität, überzugehen. Dies zeichnet sich durch wechselnde Phasen der Depolarisation (Burst) mit kontinuierlicher Spikeaktivität (durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktionspotentiale), und Repolarisation ohne elektrische Aktivität (Interburst) aus (Abb. 1.2A).

Hierbei ist das Repolarisationspotential deutlich positiver als das Ruhemembranpotential. Der erste Spike einer Burst-Phase beginnt mit dem schnellen

Anstieg vom Schwellenpotential zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktionspotential. Das einzelne Aktionspotential wird zum einen durch Inaktivierung der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Satin und Cook 1989, Cook et al. 1991) und zum anderen durch Aktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle ( $\text{K}_v$ -Kanäle) beendet (Smith et al. 1990b). Es kommt zu einer Repolarisation auf das Plateaupotential, welches positiver als das Schwellenpotential ist (Abb. 1.2B). Von diesem Potential aus folgen weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktionspotentiale.

Innerhalb einer Burst-Phase nimmt die Frequenz der Aktionspotentiale mit der Zeit ab. Dies deutet ebenfalls auf eine Inaktivierung der Calciumkanäle hin (Ashcroft und Rorsman 1989). Die verschiedenen Hypothesen über den Mechanismus der zum Beenden der Burst-Phase auf das Repolarisationspotential führt, werden im Kapitel 1.5.4 ausführlich diskutiert. Das glucoseinduzierte Muster elektrischer Aktivität der B-Zelle wird auch als slow waves bezeichnet, da der Wechsel zwischen Burst- und Interburst-Phasen unter stimulatorischer Glucosekonzentration wellenförmig verläuft (Abb. 1.2A). Der prozentuale Anteil der depolarisierten Phasen des Membranpotentials mit Spikeaktivität wird als fraction of plateau phase (FOPP) bezeichnet. Die FOPP erhöht sich mit steigender Glucosekonzentration und ist bei 15 mM Glucose halbmaximal. Ab ca. 20 mM Glucose sind die Zellen dauerdepolarisiert mit kontinuierlicher Spikeaktivität (Abb. 1.2A).

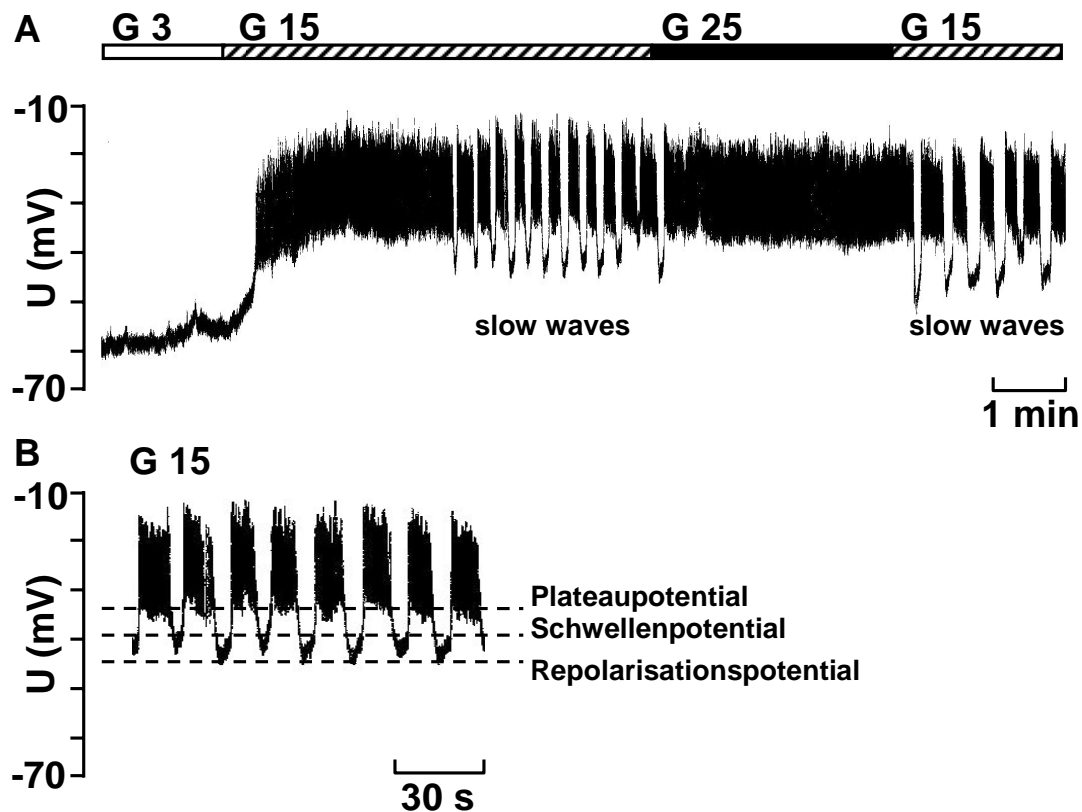


Abb. 1.2A: Mikroelektrodenableitung des Membranpotentials einer WT B-Zelle, im funktionellen Verband ihrer Langerhans-Insel, bei verschiedenen Glucosekonzentrationen. B: größere zeitliche Auflösung einzelner Burst und Interburst-Phasen der slow waves bei 15 mM Glucose.

### 1.5.3 Beziehung zwischen extrazellulärer Glucosekonzentration und intrazellulärer Calciumkonzentration der B-Zelle

Durch die Einführung fluoreszenzoptischer Methoden ist es möglich geworden die intrazelluläre Calciumkonzentration in Zellen zu bestimmen.

Die Arbeitsgruppe um Roger Tsien hat sich hier besonders verdient gemacht und die Methode zur Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration etabliert (Grynkiewicz et al. 1985). Damit war es erstmals möglich, die Auswirkung von Glucose auf die intrazelluläre Calciumkonzentration der B-Zelle in Echtzeit zu beobachten. Messungen an isolierten Zellen, Zellclustern oder intakten Inseln ergeben einen triphasischen Verlauf (Phase 0-2; Abb. 1.3A) in  $[Ca^{2+}]_c$  nach Glucosestimulation (Grapengiesser et al. 1988a, Grapengiesser et al. 1988b).

Die Phase 0 ist gekennzeichnet durch einen initialen Abfall von  $[Ca^{2+}]_c$ . Danach kommt es zu einem raschen und länger anhaltendem Anstieg der Phase 1, mit sich anschließenden Oszillationen, ähnlich derer in  $V_m$ , in Phase 2.

Die Phase 0, der Initialabfall, wird durch Aktivierung der ATPasen des ER, d.h. durch aktive Calciumaufnahme ins ER als Reaktion auf die gesteigerte ATP-Produktion nach Glucose-Stimulus erklärt und ist deshalb unterdrückt, wenn man die Calciumaufnahme in das ER durch Hemmung der SERCA (z.B. mit Cyclopiazonsäure) unterbindet (Gylfe 1989, Roe et al. 1994; Abb. 1.3B).

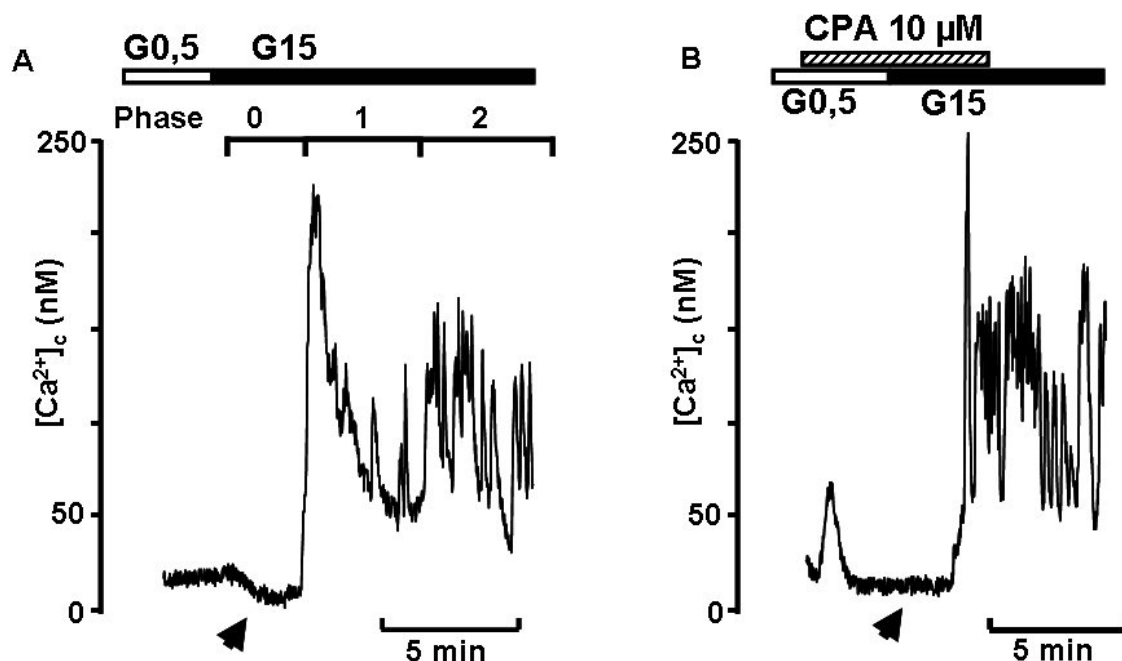


Abb. 1.3 Fluoreszenzoptische Messung von  $[Ca^{2+}]_c$ . Dargestellt ist der typische Verlauf von  $[Ca^{2+}]_c$  einer Langerhans-Insel bei unterschiedlichen Glucosekonzentrationen, jeweils ohne (A) bzw. mit (B) Inhibition der Calciumaufnahme in das ER durch Cyclopiazonsäure (CPA 10 $\mu$ M).

#### 1.5.4 Oszillationen in B-Zellen

Ein Anstieg der extrazellulären Glucosekonzentration führt zu einem typischen Muster elektrischer Aktivität in B-Zellen, den slow waves. Analog dazu beobachtet man auch Oszillationen in  $[Ca^{2+}]_c$  bei stimulatorischer Glucosekonzentration.

Gilon und Henquin (1992) konnten zeigen, dass innerhalb einer Langerhans-Insel die B-Zellen in  $[Ca^{2+}]_c$  synchron oszillieren, was auf eine Kopplung der B-Zellen untereinander hindeutet. Die Simultanmessung von  $V_m$  und  $[Ca^{2+}]_c$  in Langerhans-Inseln zeigte, dass  $[Ca^{2+}]_c$  parallel zur elektrischen Aktivität der B-Zelle verläuft (Santos et al. 1991, Abb. 1.4). Diese Beobachtung lässt auf eine Kopplung von  $V_m$  und  $[Ca^{2+}]_c$  in B-Zellen schließen.

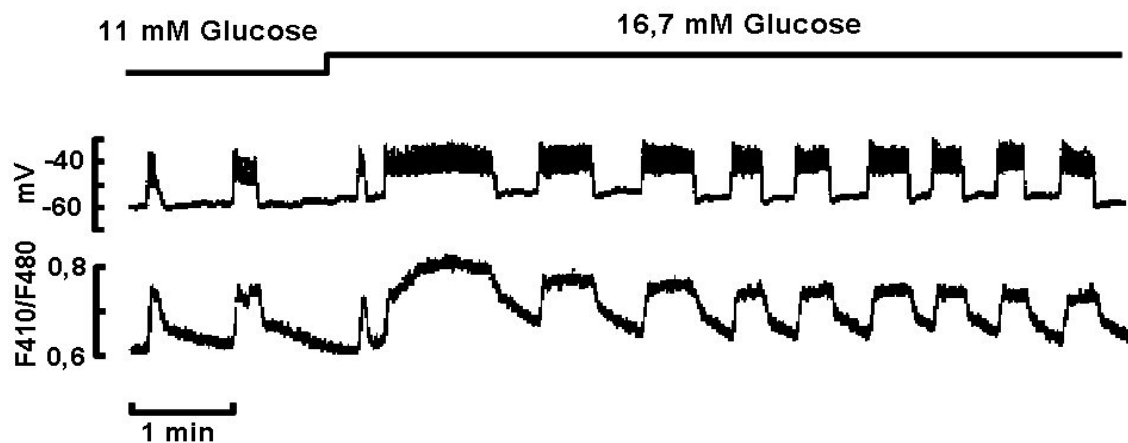


Abb. 1.4 Synchron verlaufende Oszillationen des Membranpotentials und der intrazellulären Calciumkonzentration in B-Zellen. Die Frequenz der Oszillationen nimmt mit steigender Erhöhung der Glucose zu (verändert nach Santos et al. 1991).

Es ist schon länger bekannt, dass eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration essentiell für die Insulinsekretion ist (Wollheim und Sharp 1981, Prentki und Matschinsky 1987).

In vitro Experimente zeigen eine pulsatile Insulinsekretion der B-Zelle, bei stimulatorischer Glucosekonzentration, die zeitlich mit den Oszillationen in  $[Ca^{2+}]_c$  korreliert ist (Gilon et al. 1993, Abb. 1.5).

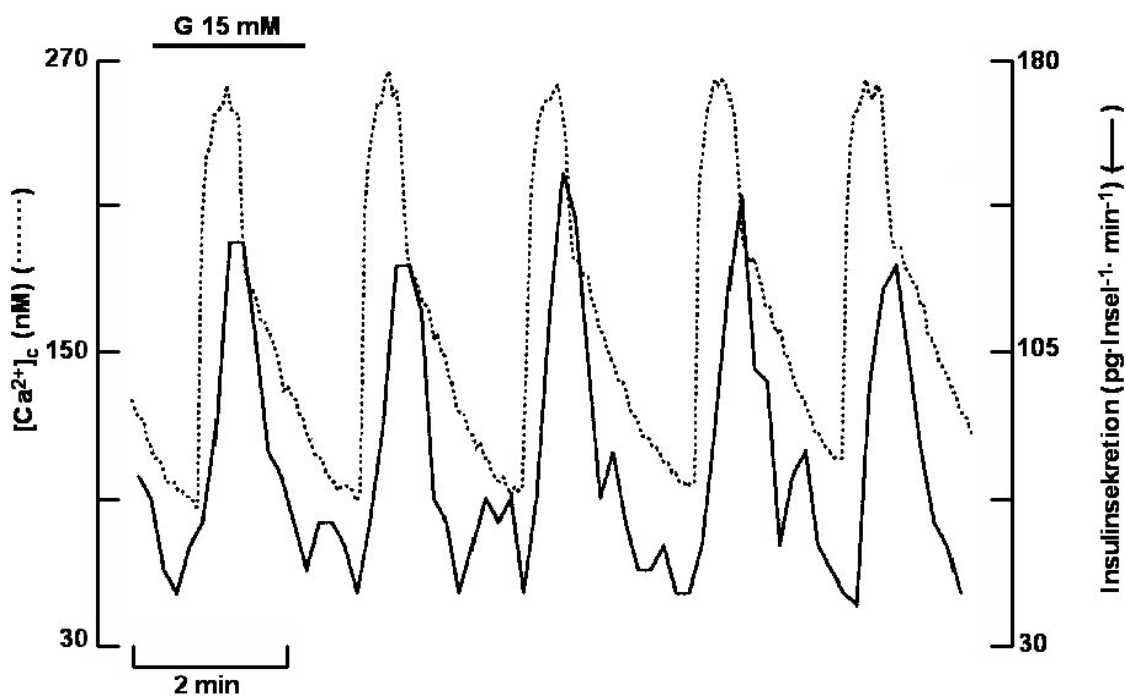


Abb. 1.5 Oszillationen in  $[Ca^{2+}]_c$  und pulsatile Insulinsekretion in B-Zellen. Einem Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration folgt eine gesteigerte Sekretion (verändert nach Gilon et al. 1993).

Depolarisiert man die B-Zelle durch Erhöhen der extrazellulären Kaliumkonzentration, so kommt es dadurch zu einem kontinuierlichen Calciumeinstrom (Gilon und Henquin 1992). Die intrazelluläre Calciumkonzentration folgt also den Veränderungen des Membranpotentials und ist direkt an diese gekoppelt. Dies bedeutet, dass durch Veränderungen der extrazellulären Glucosekonzentration, über  $V_m$  und  $[Ca^{2+}]_c$ , die Insulinsekretion reguliert werden kann. Diese Signalkaskade ist auch unter dem Begriff *triggering pathway* bekannt geworden (Henquin 2000). Dabei führt der Glucosemetabolismus zu einer Steigerung der ATP-Synthese und damit zu einem erhöhten ATP/ADP-Quotient, welcher in einer verminderten Offenwahrscheinlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle resultiert und die Burst-Phase einleitet (siehe Kap. 1.5.2).

Durch das Öffnen der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle nach Überschreiten des Schwellenpotentials kommt es zu einem verstärkten Calciumeinstrom über die Plasmamembran. Über welchen Mechanismus aber kommt es zur Beendigung der Burst-Phase, die ja erst ein oszillatorisches Verhalten ermöglicht?

Im Laufe der Jahre wurden eine Reihe verschiedener Hypothesen aufgestellt: Zunächst wurde die Aktivierung von  $K(Ca^{2+})$ -Kanälen diskutiert, da ja während des Bursts verstärkt Calcium über die Membran einströmt und so membranständige  $K(Ca^{2+})$ -Kanäle aktivieren könnte (Henquin 1979, Atwater et al. 1979a, Ämmälä et al. 1991).

Ebenfalls käme die langsame Inaktivierung der spannungsabhängigen Calciumkanäle (Cook et al. 1991, Keizer und Smolen 1991) als Ursache für die Repolarisation in Betracht.

Andreu et al. (1997) postulierten, dass eine verminderte gap junction Kopplung der B-Zellen untereinander zu einer Modulation der elektrischen Aktivität führt, die an der Beendigung der Burst-Phase beteiligt sein soll. Ebenfalls wurde die Beteiligung eines speicherinduzierten Stromes (Dukes et al. 1997, Gilon et al. 1999) in Betracht gezogen. Henquin gelang es 1990, durch Blockade der  $K_v$ - und  $K(Ca^{2+})$ -Kanäle mit  $TEA^+$ , deren Beteiligung an den glucoseinduzierten Oszillationen auszuschließen. Er postulierte, dass vielmehr eine Zunahme des  $K_{ATP}$ -Stromes zur Beendigung der Burst-Phase führt. Diese Theorie wurde von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt (Ding et al. 1996, Larsson et al. 1996) und gilt bis heute als unumstritten. Rolland et al. (2002) konnten zeigen, dass ein induzierter Anstieg in  $[Ca^{2+}]_c$  eine Zunahme des  $K_{ATP}$ -Stromes zur Folge hat. Es wurde weiterhin gezeigt, dass das mitochondrielle Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) den Calciumoszillationen synchron folgt (Krippeit-Drews et al. 2000, Düfer 2001). An einer insulinsezernierenden B-Zell-Linie (INS-1) konnte gezeigt werden, dass durch Erhöhen der Glucosekonzentration die intramitochondrielle Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_m$ ), parallel zur Erhöhung in  $[Ca^{2+}]_c$ , ansteigt (Kennedy et al. 1996).

Damit lässt sich eine Depolarisation in  $\Delta\Psi$ , wie sie von Krippeit-Drews et al (2000) beschrieben wird, erklären. Die Depolarisation in  $\Delta\Psi$  hat die Hemmung der ATP-Produktion zur Folge und der ATP/ADP-Quotient wird zugunsten von ADP verschoben. Dadurch öffnen nun die  $K_{ATP}$ -Kanäle wieder,  $I(K_{ATP})$  nimmt zu und die Burst-Phase wird beendet. Durch die Hyperpolarisation auf das Repolarisationspotential schließen die L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle, was zum Absinken in  $[Ca^{2+}]_c$  führt. Letztlich nimmt damit auch die Calciumkonzentration der Mitochondrien ab, diese repolarisieren und die ATP-Produktion steigt wieder an. Dadurch verringert sich nun wieder die Offenwahrscheinlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle und die Kaliumleitfähigkeit nimmt ab, wodurch ein bislang unbekannter depolarisierender Strom in den Vordergrund tritt und eine neue Burst-Phase nach Überschreiten des Schwellenpotentials auslöst. Somit reguliert das Öffnen und Schließen der  $K_{ATP}$ -Kanäle die oszillatorische Aktivität der B-Zelle. Kjems et al. (2002) zeigten, dass Calciumoszillationen eine Voraussetzung für die pulsatile Insulinsekretion sind.

Welchen Nutzen könnten diese Oszillationen für die Zelle haben? Der Calciumeinstrom in die B-Zelle ist unerlässlich für die Sekretion. Gleichzeitig stellt er aber auch eine potentielle Gefahr der Calciumüberladung und damit eine Induktion für Apoptose dar

(Farber 1981, Gunter et al. 1994). Möglicherweise schützt sich die Zelle also durch die Oszillationen. Paolisso et al. (1991) postulierten eine verbesserte Insulinwirkung an den Zielorganen bei pulsatilem Insulinsekretion. Oszillationen scheinen für die Glucosehomöostase und Insulinwirkung unerlässlich, zeigen doch Patienten mit Typ-2 Diabetes eine gestörte pulsatile Insulinsekretion (Lang et al. 1981).

## 1.6 Ionenkanäle und ihre Bedeutung für die B-Zelle

Für pankreatische B-Zellen sind eine Reihe von Ionenkanälen beschrieben und charakterisiert worden. An erster Stelle stehen ATP-abhängige Kaliumkanäle, die für die elektrische Aktivität der Zelle von großer Bedeutung sind. Des Weiteren findet man spannungsgesteuerte und Calcium-abhängige Kaliumkanäle sowie spannungsabhängige Calciumkanäle und Volumen-sensitive Anionenkanäle, die hauptsächlich Chlorid transportieren. Vermutlich finden sich noch weitere, bislang unbekannte, Ionenkanäle in der B-Zell-Membran.

Es gibt zudem Hinweise auf die Existenz von Ionenkanälen an intrazellulären Organellen wie Mitochondrien, Kern, Vesikel und ER in B-Zellen, doch wird deren Existenz noch kontrovers diskutiert, da über ihre Funktion wenig bekannt ist.

### 1.6.1 Der ATP-abhängige Kaliumkanal

ATP-abhängige Kaliumkanäle, kurz  $K_{ATP}$ -Kanäle genannt, wurden zuerst in Herzmuskelzellen entdeckt (Noma 1983). Mittlerweile hat man  $K_{ATP}$ -Kanäle unter anderem auch in Skelettmuskelzellen, in glatten Muskelzellen, Neuronen und in A- und B-Zellen des Pankreas gefunden.

$K_{ATP}$ -Kanäle bestehen immer aus zwei Untereinheiten (UE): der regulatorischen, dem Sulfonylharnstoffrezeptor SUR und der porenbildenden Untereinheit  $K_{ir}$ , die den eigentlichen Kanal ausbildet.  $K_{ir}$  steht für einen einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal (inward rectifier). Unterhalb des Umkehrpotentials verläuft seine Strom-Spannungskurve linear, damit sind seine Ströme in diesem Bereich größer als bei vergleichbaren Potentialen die über dem Umkehrpotential liegen. Der Sulfonylharnstoffrezeptor gehört zur Familie der ATP-bindenden Transportproteine (ABC-Transporter-Superfamilie).

Die ABC-Gene kodieren für die größte Familie der Transmembranproteine. Sie binden ATP und benutzen die Energie bei der Phosphatatspaltung um den Transport verschiedener Moleküle über die Zellmembran zu gewährleisten. Dies trifft allerdings nicht für den  $K_{ATP}$ -Kanal der B-Zelle zu. Die Gene, auf denen die Proteine zu finden sind, werden bei Mensch und Maus mit ABC(A-G) bezeichnet. SUR1, welcher in pankreatischen B-Zellen nachgewiesen wurde, ist ein Vertreter der Klasse ABCC. Diese Klasse lässt sich noch weiter in 12 Unterklassen einteilen, wobei SUR1 der Unterklasse 8 angehört und demnach seine korrekte Bezeichnung ABCC8 lautet. ABC-Transporter enthalten zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBD) und mehrere transmembranäre Domänen (TMD).

Die Mitglieder der  $K_{ir}$ -Familie tragen die Bezeichnung KCNJ(1-15). Man unterscheidet sieben verschiedene  $K_{ir}$ -Familien. KCNJ11 ist die Bezeichnung für  $K_{ir}6.2$ , welcher die Pore in pankreatischen B-Zellen ausbildet.  $K_{ATP}$ -Kanäle sind heteromultimere aus jeweils vier SUR1 und vier  $K_{ir}6.2$  Untereinheiten, bilden zusammen also ein Oktamer, wobei der N-Terminus von  $K_{ir}6.2$  in räumlicher Nachbarschaft zum C-Terminus von SUR1 ist (Clement et al. 1997, Abb. 1.6).

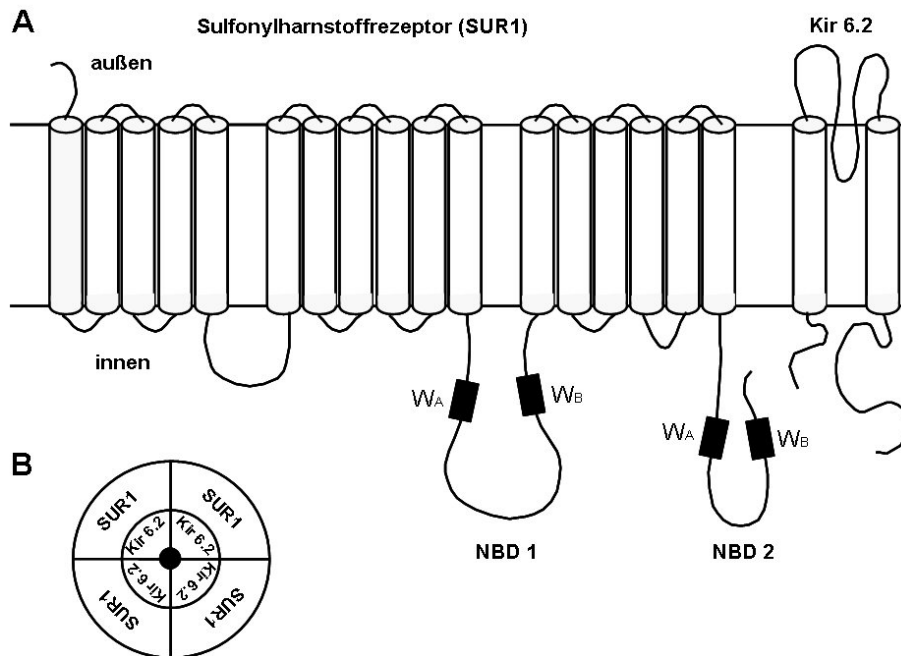


Abb. 1.6 Transmembranäre (A) und räumliche Anordnung (B) der Untereinheiten des  $K_{ATP}$ -Kanals der B-Zelle. W<sub>A</sub>, W<sub>B</sub> stehen für Walker A- und B-Region. (verändert nach Ashcroft und Gribble 1999)

Jede SUR1-UE besteht aus 17 transmembranären Helices, die in drei Domänen (TMD 0-2) angeordnet sind (Tusnady et al. 1997, Mikhailov et al. 2002) sowie den nukleotidbindenden Domänen NBD1 und NBD2, die jeweils aus einer Walker A- und Walker B-Region bestehen (Walker et al. 1982). Interessanterweise können isolierte SUR1-Proteine Sulfonylharnstoffe mit einer hohen Affinität binden (Aguilar-Bryan et al. 1995), werden allerdings ohne die porenbildende Untereinheit nicht in die Membran eingebaut und bilden somit keinen funktionsfähigen Kanal. Dies gilt auch im umgekehrten Fall, so dass nur die Koexpression beider Untereinheiten zu einem funktionstüchtigen  $K_{ATP}$ -Kanal führt (Inagaki et al. 1995, Sakura et al. 1995, Inagaki et al. 1996).

Zerangue et al. (1999) konnten zeigen, dass die SUR1-UE für das korrekte *trafficking* der Kanalproteine zur Plasmamembran verantwortlich ist. So existiert an der  $K_{ir}$ -UE eine Signalsequenz, die durch SUR1 abgeschirmt werden muss, damit der Kanal in die Plasmamembran eingebaut wird. Tucker et al. (1997) konnten zeigen, dass durch Verkürzen des C-Terminus an  $K_{ir}6.2$ , um 26 bzw. 36 Aminosäuren, die Expression der isolierten  $K_{ir}$ -UE möglich ist.

Somit kann die Funktion des C-Terminus von  $K_{ir}6.2$  als Suppressor des *trafficking* betrachtet werden. SUR1 unterbricht diese Suppressorfunktion und ermöglicht so den korrekten Einbau in die Plasmamembran.

Neben SUR1 kennt man noch die UE SUR2A und SUR2B, die in Kardiomyozyten bzw. in glatten Muskelzellen vorkommen (Inagaki et al. 1996). Sie bilden zusammen mit  $K_{ir}6.2$   $K_{ATP}$ -Kanäle aus.  $K_{ir}6.1$  wird zudem in Muskelzellen exprimiert (Sun et al. 2004, Van Bever et al. 2004).

Die Regulation der  $K_{ATP}$ -Kanäle in der B-Zelle ist aufgrund ihrer Komplexizität noch nicht vollständig aufgeklärt. Sicher ist, dass ein Anstieg des ATP/ADP-Quotienten die  $K_{ATP}$ -Kanäle schließt. Die genaue Regulation des Kanals ist für die elektrische Aktivität der B-Zelle sehr wichtig. Es konnte gezeigt werden, dass das Zusammenspiel der Nukleotide ATP, ADP, MgATP und MgADP für die Regulation von großer Bedeutung ist und somit die Kanalaktivität nicht allein von ATP abhängig ist (Ashcroft und Rorsman 1989).

Der  $K_{ATP}$ -Kanal wird durch Bindung von ATP an das N-terminale Ende von  $K_{ir}6.2$  (Tucker et al. 1997) geschlossen. ATP bindet aber auch an SUR1 in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  (Ueda et al. 1999). Da nur Mutationen in der NBD1 aber nicht in der NBD2 zu

einer veränderten ATP-Bindung führen, wurde für NBD1 eine  $Mg^{2+}$ -unabhängige ATP-Bindungsstelle vermutet (Nichols et al. 1996, Ueda et al. 1999). MgADP, welches an NBD2 bindet, soll die ATP-Bindung an NBD1 antagonisieren.

Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen allerdings, dass obwohl durch NBD2-Mutationen die Aktivierung durch MgADP aufgehoben wird (Nichols et al. 1996, Gribble et al. 1997), Mutationen in der NBD1 und/oder der NBD2 zu keinen Veränderungen in der ATP-Sensitivität der  $K_{ATP}$ -Kanäle führen (Gribble et al. 1997, Shyng et al. 1997). Hinzu kommt, dass Tucker et al. (1997) zeigen, dass eine um 26 bzw. 36 Aminosäuren verkürzte  $K_{ir}$ -UE in Abwesenheit von SUR1 eine durch ATP hemmbare Pore ausbildet, deren ATP-Sensitivität durch Co-Expression mit SUR1 gesteigert werden kann.

Diese Daten lassen vermuten, dass die  $K_{ir6.2}$ -UE die primäre ATP-Bindungsstelle trägt, während die SUR1-UE die ATP-Sensitivität der  $K_{ir6.2}$ -UE erhöht (Shyng et al. 1997, Tucker et al. 1997). MgATP aktiviert wie MgADP den  $K_{ATP}$ -Kanal über Interaktion mit NBD1 und NBD2 (Gribble et al. 1998).

Pharmakologisch lässt sich der  $K_{ATP}$ -Kanal durch Agonisten wie Diazoxid und Antagonisten wie Sulfonylharnstoffe bzw. Glinide beeinflussen. Diazoxid bindet innerhalb der Transmembranhelix 17 und führt zu einer Öffnung des Kanals. Seine Wirkung kann durch Nukleotidbindung potenziert werden (Gribble und Reimann 2002). Sulfonylharnstoffe, die in der Therapie des Typ 2-Diabetes eingesetzt werden, binden innerhalb zweier intrazellulärer Schleifen an SUR1 und führen so zum Schließen des Kanals.

Babenko et al. 1999 postulierten die Bindung zwischen der 12 und 17 TMD. Die dabei ausgelöste Konformationsänderung soll den geschlossenen Zustand des Kanals stabilisieren. MgATP bzw. MgADP verstärken interessanterweise die Kanalinhibition der Sulfonylharnstoffe (Panten et al. 1990, Schwanstecher et al. 1992, Gribble et al. 1998). Als Erklärung des paradoxen Verhaltens der Mg-Nukleotide wird die Konformationsänderung der Kanalproteine aufgrund der Sulfonylharnstoffbindung diskutiert.

Die Konzentration, die zur vollständigen Blockade des  $K_{ATP}$ -Kanals im exzidierten patch an isolierten B-Zellen benötigt wird, liegt im mikromolaren Bereich (Cook und Hales 1984). Der ATP-Gehalt der B-Zelle hingegen beträgt 3-5 mM (Ashcroft et al. 1973, Matschinsky et al. 1976, Malaisse et al. 1979). Dies bedeutet, dass der Kanal unter physiologischen Bedingungen ständig geschlossen sein müsste. Dies ist jedoch nicht der Fall, da die Zelle sonst ständig Insulin ausschütten würde und für eine

Regulation der Glucosehomöostase nicht mehr zu gebrauchen wäre. Man muss also annehmen, dass es in den B-Zellen Mechanismen gibt, die direkt an den  $K_{ATP}$ -Kanälen dafür sorgen, dass nur ATP aus bestimmten Pools registriert wird. Da die Mitochondrien der einzig bekannte Syntheseort für ATP aus Reduktionsäquivalenten der Glycolyse ist, stellt sich die Frage wie das ATP zu den  $K_{ATP}$ -Kanälen transportiert wird, da ein gezielter Transport energetisch günstiger erscheint als der Transport durch Diffusion.

Panten et al. (1986) konnten das Vorhandensein einer Creatinkinase in B-Zellen nachweisen. Creatinkinasen sind in der Lage unter ATP-Verbrauch Creatin zu Phosphocreatin umzusetzen. Für B-Zellen konnte Creatinkinaseaktivität im Cytosol nachgewiesen werden (Yasuda et al. 1990, White et al. 1992, Detimary et al. 1999).

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Konzentration des intrazellulären Phosphocreatins nach Glucosestimulation parallel zum Anstieg des ATP/ADP-Quotienten ansteigt. Phosphocreatin führt zu einer Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle im exzidierten inside-out patch (Krippeit-Drews et al. 2003, Bäcker 2005).

Zusammengefasst ergibt sich folgendes Modell: ATP wird am Ort seines Entstehens mittels einer Creatinkinase zu Phosphocreatin umgewandelt und in dieser Form direkt zu den  $K_{ATP}$ -Kanälen transportiert. Dort wird es mittels einer membranständigen, nahe der  $K_{ATP}$ -Kanäle lokalisierten Creatinkinase durch Phosphorylierung von ADP zu ATP resynthetisiert (Krippeit-Drews et al. 2003, Bäcker 2005). Somit könnte eine physische Barriere für ATP an den  $K_{ATP}$ -Kanälen diese von cytosolischem ATP abschirmen. Die Creatinkinase müsste demnach in der Lage sein diese Barriere zu überwinden um so das über die Glycolyse gebildete ATP direkt zu den  $K_{ATP}$ -Kanälen zu transportieren. Untersuchungen von Herzmuskelzellen aus Creatinkinase-Knockout-Mäusen stützen diese Theorie (Abraham et al. 2002).

## 1.6.2 Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Spannungsabhängige Kaliumkanäle in B-Zellen wurden erstmals von Rorsman und Trube (1986) beschrieben. Sie gehören zu den verzögernd gleichrichtenden Kaliumkanälen ( $K_{DR}$ , delayed rectifier), einer Kategorie mit langsamer Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik (Ashcroft und Rorsman 1989).  $K_v$ -Kanäle wurden erstmals aus *Drosophila* kloniert (Butler et al. 1989). Daher tragen die vier Hauptfamilien der  $K_v$ -Kanäle unterschiedliche Trivialnamen:  $K_v1.X$  (Shaker),  $K_v2.X$  (Shab),  $K_v3.X$  (Shaw),

K<sub>v</sub>4.X (Shal). Kaliumkanäle lassen sich durch die Anzahl ihrer TMDs einteilen. K<sub>v</sub>-Kanäle gehören zu der Klasse mit 6 TMDs. Sie besitzen daher sechs transmembranäre  $\alpha$ -Helices (S1-S6) mit intrazellulären N- und C-Termini. Die hydrophobe porenbildende Schleife ist zwischen S5 und S6 lokalisiert (Kamb et al. 1987). Der Spannungssensor ist auf S4 lokalisiert und wird durch eine hohe Anzahl positiv geladener Aminosäuren (Lysin und Arginin) gebildet (Papazian et al. 1991).

Neben pankreatischen B-Zellen finden sich K<sub>v</sub>-Kanäle noch in sehr vielen anderen Geweben, u.a in Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Milz, Darm, Skelettmuskel (Ottschytch et al. 2002). Bislang kennt man zwölf verschiedene K<sub>v</sub>-Familien K<sub>v</sub>1-K<sub>v</sub>12 die sich in weitere Subfamilien aufteilen, wobei die Familien 5-12 keine funktionsfähigen Kanäle ausbilden, sondern mit anderen Kanälen interagieren können und diese dadurch modulieren. Bislang ist noch unklar welche davon in pankreatischen B-Zellen exprimiert werden. Betsholtz et al. haben 1990 die Expression von K<sub>v</sub>1.X in Inseln aus ob/ob-Mäusen nachweisen können. Allerdings zeigt die Arbeit von Roe et al. aus dem Jahr 1996, dass in isolierten B-Zellen der Maus K<sub>v</sub>1.X nicht exprimiert wird, jedoch K<sub>v</sub>2.1 und K<sub>v</sub>3.2. In insulinsezernierenden INS-1 Zellen findet man die Expression von K<sub>v</sub>1.4 und K<sub>v</sub>1.5 (Su et al. 2001).

In B-Zellen der Maus wurde darüber hinaus auch K<sub>v</sub>3.4 (Göpel et al. 2000, MacDonald und Wheeler 2003) und in B-Zellen der Ratte K<sub>v</sub>4.2 nachgewiesen (MacDonald et al. 2002a). In humanen B-Zellen konnte bislang K<sub>v</sub>2.1, K<sub>v</sub>3.2, K<sub>v</sub>6.2 und K<sub>v</sub>9.3 nachgewiesen werden (Yan et al. 2004).

Die Bedeutung der einzelnen K<sub>v</sub>-Kanäle für die B-Zelle ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Hemmt man K<sub>v</sub>-Kanäle unspezifisch mit TEA<sup>+</sup>, so kommt es zu einem Anstieg der elektrischen Aktivität unter stimulatorischer Glucosekonzentration und damit zu einer verstärkten Insulinsekretion (Henquin 1990, MacDonald et al. 2002b). Weiterführende Untersuchungen in B-Zellen haben gezeigt, dass K<sub>v</sub>-Kanäle maßgeblich an der Repolarisation der Ca<sup>2+</sup>-Aktionspotentiale beteiligt sind (Smith et al. 1990b). Dadurch wird der Calciumeinstrom durch L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und damit auch die Insulinsekretion limitiert (MacDonald und Wheeler 2003).

### 1.6.3 Calciumabhängige Kaliumkanäle

Bei den calciumabhängigen Kaliumkanälen unterscheidet man solche mit großer (BK), mittlerer (IK) und kleiner (SK) Leitfähigkeit. BK-Kanäle sind zudem im Gegensatz zu SK und IK spannungsabhängig. Alle drei Typen sind in B-Zellen mittels PCR, durch

Immunhistochemie (Ferrer et al. 1996, Ishii et al. 1997, Tamarina et al. 2003) oder elektrophysiologisch (Findlay et al. 1985, Marty 1989, Ämmälä et al. 1991, 1993b, Neye 2004) nachgewiesen worden. Über ihre Funktion in B-Zellen ist trotz umfangreicher elektrophysiologischer Untersuchungen jedoch wenig bekannt.

Tamarina et al. (2003) zeigten, dass eine Hemmung der SK-Kanäle in B-Zellen durch Apamin zu einer Frequenzsteigerung der Calciumoszillationen führt. Sie schließen daraus auf eine Funktion der Kanäle bei der Repolarisation der Calciumaktionspotentiale. Allerdings haben andere Arbeitsgruppen keinen Apamin-Effekt auf calciumaktivierte  $K^+$ -Ströme, Membranpotential oder Insulinsekretion nachweisen können (Ämmälä et al. 1993b, Lebrun et al. 1983). In pankreatischen B-Zellen bzw. insulinproduzierenden Zelllinien ( $\beta$ TC3-Zellen) wurden calciumaktivierte  $K^+$ -Ströme beschrieben, die sowohl auf die Charakteristik der IK- als auch der SK-Kanäle zutreffen (Ämmälä et al. 1993b, Kozak et al. 1998, Göpel et al. 1999, Goforth et al. 2002). Hinzu kommt, dass Göpel et al. (1999) von einem calciumaktivierten Kaliumstrom in der B-Zelle berichten, der sich nicht einem bisher bekannten Kanal (IK, SK oder BK) zuordnen lässt. Zur Detektion des Stroms wurde eine niedrige Glucosekonzentration (5 mM) gewählt, die die glucoseinduzierte elektrische Aktivität unterdrückt. Nun wurde ein Spannungssprung von -70 mV auf -40 mV appliziert und der Zelle 26 simulierte Aktionspotentiale aufgeprägt. Durch dieses Manöver sollte eine Burst-Phase imitiert werden. Dabei konnte ein Kaliumstrom gemessen werden, der durch Calcium aktivierbar ist. Da er langsam aktiviert, wird er als  $I_{K,slow}$  bezeichnet. Er soll neben dem  $K_{ATP}$ -Strom für die Regulation der Membranpotentialoszillationen verantwortlich sein und insbesondere an der Repolarisation der Burst-Phase beteiligt sein (Göpel et al. 1999).

Goforth et al. (2002) konnten zeigen, dass  $I_{K,slow}$  vom Füllungsstatus des ER abhängt und durch Substanzen die das ER beeinflussen, modulierbar ist. Weitere Studien sind nötig, um die Rolle der calciumaktivierten Kaliumströme SK und IK in der B-Zelle zu erklären und  $I_{K,slow}$  einem Kanal zuzuordnen bzw. seine Rolle bei den glucoseinduzierten Oszillationen aufzuklären.

Ende der siebziger bis in die achtziger Jahre wurde dem BK-Kanal in der B-Zelle eine direkte Beteiligung an der Regulation der Oszillationen zugesprochen. Man nahm an, dass er für die Repolarisation der Burst-Phase verantwortlich sein soll (Atwater et al. 1979a, 1979b, 1983).

Diese Annahme leitete sich jedoch von Untersuchungen ab, bei denen Chinin, ein völlig unspezifischer Hemmstoff für BK-Kanäle, verwendet wurde, da er auch den  $K_{ATP}$ -

Kanal hemmt. Charybdotoxin ist ein Toxin des Skorpions *Leirus quinquestriatus* und ein spezifischer Blocker für  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle (Gimenez-Gallego et al. 1988). Es inhibiert sowohl IK- als auch BK-Kanäle (Miller et al. 1985, Pavenstädt et al. 1991).

Kukuljan et al. (1991) konnten damit zeigen, dass durch selektive Blockade der calciumaktivierten Kaliumkanäle in der B-Zelle keine Beeinflussung des Membranpotentials auftritt und somit eine Beteiligung dieser Kanäle an den Oszillationen und damit auch an der Repolarisation der Burst-Phase ausgeschlossen werden kann. Bereits ein Jahr zuvor wurde gezeigt, dass durch 2 mM  $\text{TEA}^+$ , wodurch  $\text{K}_v$ - und  $\text{K}(\text{Ca}^{2+})$ -Kanäle blockiert werden, die glucoseinduzierte elektrische Aktivität bzw. die Insulinsekretion nicht verändert werden (Henquin 1990). Iberiotoxin, ein Toxin des Skorpions *Buthus tamulus*, gilt als selektiver Blocker des BK-Kanals (Galvez et al. 1990, Garcia et al. 1991). Yvonne Neye konnte in ihrer Dissertation „Die Bedeutung von  $\text{K}^+$ -Kanälen für die physiologische Funktion und pharmakologische Beeinflussung pankreatischer B-Zellen“ (2004) zeigen, dass durch Blockade des BK-Kanals mit Iberiotoxin der Strom durch sämtliche  $\text{K}^+$ -Kanäle der B-Zelle (unter standard whole-cell Bedingungen, bei Spannungssprüngen von -70 auf 0 mV) ohne Berücksichtigung der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle nicht beeinflusst wird. In Versuchen mit BK-Kanaldefizienten Mäusen, konnte sie zeigen, dass der BK-Kanal die Aktionspotentialform der glucoseinduzierten Calciumaktionspotentiale moduliert. Die Aktionspotentiale der KO-Mäuse weisen eine vergrößerte Peakhalbwertsbreite auf. Außerdem ist die Nachhyperpolarisation vermindert oder fehlt.

#### 1.6.4 Spannungsabhängige Calciumkanäle

Spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bestehen aus fünf Untereinheiten ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). Die  $\alpha_1$ -UE ist mit der  $\beta$ -UE und die  $\alpha_2$ -UE ist mit der  $\delta$ -UE über Disulfidbrücken assoziiert. An der  $\alpha_1$ -UE, der größten UE mit 190-250 kDa, sind der Spannungssensor und zwei Calciumsensordomänen L und K, die Calcium- und Calmodulin-Bindungsstellen aufweisen, lokalisiert. Außerdem greifen hier die Kanalblocker vom Dihydropyridin-, Phenylalkylamin- und Benzothiazepin-Typ an (Abernethy und Soldatov 2002).

Die  $\beta$ -UE soll für die Expression und den korrekten Einbau des Kanalkomplexes verantwortlich sein und darüber hinaus die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme durch Interaktion mit der  $\alpha_1$ -UE modulieren (Singer et al. 1991, Hullin et al. 1992, Tareilus et al. 1997, Catterall 2000, Arikath und Campbell 2003).

Spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sind in den verschiedensten elektrisch erregbaren Zellen für die Signaltransduktion von Bedeutung. Sie werden in zwei Klassen eingeteilt: high voltage activated (HVA)-Calciumkanäle und low voltage-activated (LVA)-Calciumkanäle. Die HVA-Calciumkanäle sind aus mindestens vier verschiedenen Genen zusammengesetzt, die für die verschiedenen Untereinheiten kodieren (Hofmann et al. 1999). Zu den HVA zählen die Calciumkanäle vom L-, N-, P- und Q-Typ, während T-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu den LVA-Calciumkanälen gerechnet werden (Hofmann et al. 1994).

Darüber hinaus bezeichnet man sie anhand der Gene, die für unterschiedliche  $\alpha_1$ -UE kodieren. Bislang sind drei Genfamilien bekannt:  $\text{Ca}_v1.X$  bis  $\text{Ca}_v3.X$ . Die  $\text{Ca}_v1.1$ - bis  $\text{Ca}_v1.4$ -Familie repräsentiert die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, während  $\text{Ca}_v2.1$  bis  $\text{Ca}_v2.3$  die P/Q-, N- und R-Typ-Kanäle repräsentieren. T-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle werden der  $\text{Ca}_v3.1$ - bis  $\text{Ca}_v3.3$ -Familie zugerechnet.

In pankreatischen B-Zellen der Maus wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom fast ausschließlich durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vermittelt, die durch L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker vom Dihydropyridin-Typ (Nifedipin und Nitrendipin) bzw. Phenylalkylamin-Typ (Gallopamil) gehemmt werden können (Rorsman und Trube 1986, Plant 1988b). Durch Nifedipin kommt es zudem zum sofortigen Beenden der Oszillationen in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Dryselius et al. 1999).

Die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle der B-Zelle aktivieren erst ab Spannungen, die positiver als -50 mV sind (Plant 1988a), gehören also zu den HVA-Calciumkanälen. Man geht heute davon aus, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktionspotentiale während der Burst-Phasen in Maus B-Zellen praktisch ausschließlich durch L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle getragen werden. Die genaue Identität des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals der B-Zelle ist nicht eindeutig geklärt. Barg et al. (2001) berichten von  $\text{Ca}_v1.2$ , während Yang et al. (1999) die Expression von  $\text{Ca}_v1.3$  in B-Zellen nachgewiesen haben. Allerdings zeigen Untersuchungen an  $\text{Ca}_v1.2$  Knockout Mäusen, dass der Dihydropyridin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom fehlt. Dies deutet darauf hin, dass  $\text{Ca}_v1.2$  die einzige L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal Variante ist, die in B-Zellen exprimiert wird (Schulla et al. 2003). Nur ca. 50% des whole-cell  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromes wird von L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen getragen (Gilon et al. 1997). Daher muss es noch weitere Calciumkanäle in den B-Zellen geben. Es konnte gezeigt werden, dass auch P/Q- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in Maus B-Zellen exprimiert werden (Ligon et al. 1998, Takahashi et al. 2000) und R-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ( $\text{Ca}_v2.3$ ) ebenfalls zu ca. 23% am Gesamtcalciumstrom der B-Zelle beteiligt sind (Schulla et al. 2003, Jing et al. 2005).

Die Experimente von Schulla et al. (2003) zeigten jedoch, dass in B-Zellen ohne  $\text{Ca}_v1.2$  die glucoseinduzierte Insulinsekretion in vitro um 80% und in vivo praktisch völlig zum

Erliegen kommt. Das bedeutet, dass hauptsächlich der Calciumstrom durch  $Ca_v1.2$ -Kanäle also der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle und nicht der P/Q- bzw. R-Typ-Kanäle für die Insulinsekretion von Bedeutung ist.  $Ca_v2.3$  (R-Typ) soll an der Regulation der zweiten Phase der Insulinsekretion beteiligt sein (Yang und Berggren 2005). In Ratteninseln (Satin und Cook 1988) und humanen B-Zellen (Smith und Qualye 1993) konnte auch der T-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanal nachgewiesen werden.

Ihara et al. (1995) konnten zeigen, dass nur die Co-Expression der  $\alpha_1$ -UE zusammen mit der  $\beta_2$ -UE zu funktionsfähigen Kanälen in CHO-Zellen führt, und dass deren Stromcharakteristik einem Dihydropyridin-sensitiven, spannungsabhängigen Calciumkanal entspricht. Berggren et al. (2004) gelang der Nachweis von  $\beta_2$  und  $\beta_3$  in B-Zellen der Maus. Dieselbe Studie zeigt, dass durch den Knockout der  $\beta_3$ -UE der Strom durch L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle allerdings nicht verändert ist gegenüber der Kontrolle. Die Hauptregulation der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle erfolgt über den Spannungssensor, der auf Membranpotentialänderungen reagiert. Modulieren lässt sich der Kanal durch Phosphorylierung. Dies kommt durch Aktivierung verschiedener Proteinkinasen zustande. Erhöht man die cAMP-Konzentration durch Forskolin oder GLP-1, so kommt es zu einer verminderten Inaktivierung der Kanäle (Ashcroft und Rorsman 1989, Britsch et al. 1995).

Durch Stimulierung der Proteinkinasen A und C wird ebenfalls die Kanalaktivität der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle moduliert, es kommt zu einem gesteigerten  $Ca^{2+}$ -Einstrom. Dies wird durch eine verzögerte Inaktivierung der Kanäle erklärt. (Ämmälä et al. 1993a, Ashcroft et al. 1994, Ämmälä et al. 1994).

Modulieren lässt sich der Calciumeinstrom auch durch steigende Gluthation-Konzentration, wodurch es zu einer Zunahme des  $Ca^{2+}$ -Stromes kommt (Ammon et al. 1983). Im Gegensatz dazu lässt sich der  $Ca^{2+}$ -Strom durch Reagenzien, die freie SH-Gruppen oxidieren und Membran permeabel sind, inhibieren (Krippeit-Drews et al. 1994, 1995).

## 1.7 Störungen der Insulinsekretion

### 1.7.1 Diabetes

Der Name Diabetes mellitus bedeutet wörtlich honigsüßer Durchfluss. Charakteristisches Symptom des unbehandelten Diabetes ist eine hohe Harnmenge (Polyurie), wobei der Harn süßlich ist, wenn die Nierenschwelle überschritten wird. Man unterscheidet Typ 1- und Typ 2-Diabetes. Typ 1-Diabetes wird durch den absoluten Mangel am Hormon Insulin verursacht. Ursache ist ein Sekretionsversagen der Langerhans-Inseln durch das Absterben der B-Zellen. Die Ursachen, die zu diesem Zelluntergang führen sind bislang nicht eindeutig geklärt.

Es werden genetische Dispositionen, Umwelteinflüsse und Virenerkrankungen mit dem Coxsackie-Virus B4 (Horwitz et al. 1998) als Auslöser einer Entzündung der Langerhans-Inseln (Insulitis) diskutiert. Diese Entzündung führt dann zu einer Autoimmunreaktion und ist letztlich für den B-Zelluntergang durch Apoptose und Nekrose verantwortlich. Durch die Zerstörung der Inselzellen wird beim Typ 1-Diabetes kein Insulin mehr produziert. Dieser Diabetestyp heißt deshalb auch insulinabhängiger Diabetes mellitus. Charakteristische Symptome für einen unbehandelnden Typ 1-Diabetes sind starker Durst, vermehrter Harndrang und Gewichtsverlust. Meistens beginnt die Erkrankung schon im Kindes- und Jugendalter, aber auch im fortgeschrittenen Alter kann sich Typ 1-Diabetes entwickeln. Die Krankheit ist derzeit noch nicht heilbar, lässt sich aber durch Insulinsubstitution behandeln.

Der Typ 2-Diabetes, dem rund 95% aller Diabetesfälle zuzuordnen sind, wird auch Altersdiabetes oder nicht insulinpflichtiger Diabetes genannt, da er zunächst mit oralen Antidiabetika therapiert wird und oftmals erst im fortgeschrittenen Lebensalter auftritt. Der Typ 2-Diabetes kommt durch eine Sekretionsstörung der B-Zellen und einer peripheren Insulinresistenz zustande. Wird beim Typ 1-Diabetes die sezernierte Insulinmenge immer geringer, so steigt sie beim Typ 2-Diabetiker immer mehr an, Insulin wirkt aber nicht mehr in ausreichendem Maße an den Zielorganen (Fettzellen und Skelettmuskulatur) und führt so ebenfalls zu erhöhter Blutzuckerkonzentration. Beim Typ 2-Diabetes spielt die genetische Disposition eine entscheidende Rolle. Die erbliche Veranlagung allein reicht jedoch in der Regel nicht aus, um an Typ 2-Diabetes zu erkranken. Hinzukommen noch verschiedene andere Faktoren, wie z.B.

Bewegungsmangel und Adipositas. Auch eine hormonelle Ursache wird für die Entstehung der Insulinresistenz, und damit des Typ 2-Diabetes, mitverantwortlich gemacht.

Das Hormon Resistin wird aus Adipozyten sezerniert und fördert die Speicherung von Fett in Fettzellen. Zunächst galten erhöhte Resistinspiegel als Auslöser für eine Insulinresistenz und damit als Kandidat für Typ 2-Diabetes (Steppan et al. 2001).

Allerdings entwickeln nicht alle adipösen Patienten automatisch Typ-2 Diabetes, obwohl sie eine Insulinresistenz aufweisen. Neuere Studien zeigten keine Verbindung zwischen Resistin und Insulinresistenz (Lee et al. 2003, Heilbronn et al. 2004). Daher ist seine Beteiligung an der Entstehung des Typ 2-Diabetes weiterhin unklar. Daneben wird eine Beteiligung von Leptin an der Entstehung der Insulinresistenz vermutet. Leptin ist wie Resistin ein Hormon der Adipozyten, welches über Hemmung von Neuropeptid Y im Hypothalamus zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und einer gesteigerten Thermogenese führt.

Segal et al. (1996) beschrieben, dass eine Insulinresistenz mit erhöhten Leptinspiegeln verbunden ist, unabhängig ob die Patienten adipös sind oder nicht. Demgegenüber steht eine Studie von Kellerer et al. (1996), die lediglich in wenigen Patienten mit Typ 2-Diabetes erhöhte Leptinspiegel nachweisen konnten, so dass sie zu dem Schluss kommen, dass erhöhte Leptinspiegel kein wesentlicher Faktor für die Entstehung einer Insulinresistenz durch Übergewicht ist. Dasselbe gilt für den Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ), welcher ebenfalls bei adipösen Patienten in den Adipozyten überexprimiert wird.

Eine neue Kategorie des Diabetes mellitus, die dem Typ 1-Diabetes zuzuordnen ist, nennt man LADA (latent autoimmune diabetes with onset in adults = latent insulinpflichtiger Diabetes im Erwachsenenalter). Hierzu werden alle Patienten gerechnet, die zunächst nicht insulinpflichtig sind, aber alle übrigen Merkmale eines Typ 1-Diabetikers aufweisen. Im Blut finden sich, ähnlich wie beim Typ 1-Diabetes, zytoplasmatische Inselzellantikörper und/oder Antikörper gegen das Enzym Glutamat-Decarboxylase (GAD). Die Insulinproduktion der B-Zellen ist eingeschränkt und häufig sprechen bereits nach wenigen Monaten Diät orale Antidiabetika nicht mehr an. Es kommt zum Sekundärversagen, so dass eine Insulinsubstitution erforderlich wird.

Die genauen Ursachen für die Entstehung eines LADA-Diabetes sind noch unklar. Man vermutet, dass ein bislang unbekanntes Ereignis (Erkrankung, Viren, Umweltgifte) den Grundstein für die Zerstörung der Inselzellen legt.

Im Unterschied zum Typ 1-Diabetes dauert der Prozess von der Initiation bis zur unwiderruflichen Zerstörung der Inselzellen beim LADA sehr viel länger: Bis zur endgültigen Diagnose des Diabetes können viele Jahre vergehen.

Eine weitere Sonderform des Diabetes mellitus wird MODY (maturity onset diabetes of the young = juveniler Typ 2-Diabetes) genannt. Er beruht auf Genmutationen, die den Glucosestoffwechsel betreffen. Die Vererbung erfolgt monogen autosomal-dominant. Die Besonderheit ist seine frühe Manifestation bereits in der Kindheit oder Jugend der Patienten. Der MODY bedarf zunächst keiner Insulintherapie, sondern ist mit oralen Antidiabetika therapierbar. 2-5 % aller Diabetiker sind von dieser Form betroffen. Man kennt bis jetzt sechs Formen von MODY. Diesen liegen Mutationen in sechs verschiedenen Genen zugrunde. Fünf davon kodieren für Transkriptionsfaktoren (HNF-1alpha, HNF-1beta, HNF-4alpha, insulin promotor factor-1 und NeuroD/BETA2).

Diese Gene werden in den B-Zellen exprimiert und führen in mutiertem Zustand zu Sekretionsstörungen. Sie bilden MODY Typ-1 und 3-6. Ein weiteres Gen kodiert für die Glucokinase, dem intrazellulären Glucosesensor der B-Zelle. Hier führt die Mutation zu MODY Typ-2, dessen Krankheitsverlauf vergleichsweise milde ist.

### 1.7.2 Hyperinsulinismus

Der kongenitale Hyperinsulinismus (CHI) ist die häufigste Ursache persistierender und rezidivierender Hypoglykämien im Säuglingsalter. In den meisten Ländern tritt er mit einer Häufigkeit von 1:25000 bis 1:50000 bei Neugeborenen auf. Beobachtet wurde kindlicher Hyperinsulinismus schon vor über 40 Jahren, allerdings wurde erst im Jahre 1976 von Stanley und Baker beschrieben, dass CHI als einer der Hauptgründe für kindliche Hypoglykämien angesehen werden muss. Sie beobachteten, dass ca. 55% aller Hypoglykämien, die bei Kindern unter einem Jahr gefunden wurden, auf CHI zurückzuführen sind. Die Hypoglykämien werden durch eine unregulierte, z.T. exzessiv hohe Insulinsekretion hervorgerufen. Die neonatale Form des Hyperinsulinismus wird als PHHI (*persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy*) oder nach neuerer Nomenklatur als HI (*hypoglycemia of infancy*) bezeichnet. Hierbei werden unterschiedliche genetische Defekte als Ursache für CHI angenommen (Meissner et al. 1999).

Manifestiert sich der Hyperinsulinismus innerhalb der ersten drei Lebensstage (schwerer neonataler Hyperinsulinismus), liegt fast immer eine Mutation im Gen für SUR1 oder K<sub>IR</sub>6.2 (Dunne et al. 1997) vor.

Die Gene für SUR1 und  $K_{IR6.2}$  liegen auf Chromosom 11 direkt nebeneinander. In beiden Genabschnitten (SUR1 hat alleine 39 Exons, Aguilar-Bryan et al. 1998) gibt es zahlreiche Mutationsmöglichkeiten, die zum rezessiv vererbten CHI führen können (Nestorowicz et al. 1998).

Etwa 60% aller Fälle von PHHI zeigen Mutationen in einem dieser beiden Gene. Die Inselzellen der Patienten zeigen eine auffällige Hyperplasie und sprechen auf eine Behandlung mit Diazoxid nicht an.

Verkarre et al. (1998) beschreiben eine sporadisch auftretende Form des Hyperinsulinismus, die in ca. 35% aller Fälle auftritt. Sie sprechen von einer fokalen adenomatösen Hyperplasie des Pankreas, bei der nicht nur B-Zellen sondern auch A-, D- und PP-Zellen betroffen sind. Als Ursache geben sie den Verlust maternaler Allele im Chromosom 11 aufgrund einer somatischen Deletion an. Dadurch werden paternal vererbte rezessive Mutationen in SUR1 demaskiert und führen zu einem Defekt der  $K_{ATP}$ -Kanäle in einem bestimmten Pankreasbereich (Verkarre et al. 1998). Der Vorteil des fokalen Hyperinsulinismus gegenüber dem totalen ist die Therapieoption. Die Pankreasresektion beschränkt sich auf die betroffene Läsion und dadurch ist eine Heilung möglich. Die Patienten werden durch den Eingriff nicht diabetisch wie es bei totaler Pankreasresektion der Fall ist.

Neben den rezessiv vererbten Formen kennt man auch dominante Formen von CHI, die im Allgemeinen einen milden Verlauf haben und jenseits des Neugeborenenalters auftreten. Bekannte Mutationen betreffen das Glukokinase- oder das Glutamat-Dehydrogenase-Gen und führen sowohl zu CHI als auch zur Hyperammonämie (Hyperinsulinismus-Hyperammonämie-Syndrom), die 1998 von Stanley et al. beschrieben wurde.

Die Hyperammonämie (zwischen 100 und 200  $\mu\text{M/l}$  Ammoniak) zeigt keine klinisch relevanten Symptome, ist aber ein wichtiger Parameter bei der Zuordnung der Hyperinsulinämieform. Interessanterweise zeigen diese Patienten eine Leucinempfindliche Hypoglykämie (Roe und Kogut 1982).

Dominant vererbte Formen des Hyperinsulinismus (intakte  $K_{ATP}$ -Kanäle) lassen sich in den meisten Fällen durch Diazoxid, einem Agonisten des  $K_{ATP}$ -Kanals, therapieren; wohingegen Mutationen des  $K_{ATP}$ -Kanals zu einer Therapieresistenz führen.

Allerdings wurde in einigen Fällen über einen Therapieerfolg bei  $K_{ATP}$ -Kanal-Mutationen berichtet. Man vermutet die Modulation eines bislang unbekanntes Kaliumkanals durch Diazoxid, der auch auf Somatostatin anspricht, als Erklärung für den Therapieerfolg (Kane et al. 1997).

Eine wichtige Substanz in der Therapie des PHHI stellt Somatostatin und seine Analoga dar, die wahrscheinlich über eine Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration (Oliver 1976) die Insulinsekretion hemmen. Wie genau der Effekt vermittelt wird, ist noch unklar. Es wurde auch eine G-Protein gekoppelte Hemmung der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle als Ursache der Sekretionshemmung diskutiert (Hsu et al. 1991).

Nifedipin, ein Antagonist an spannungsabhängigen Calciumkanälen, führte in Einzelfällen zum Therapieerfolg (Bas et al. 1999; Shanbag et al. 2002). Bei absoluter Therapieresistenz bleibt letztlich nur die teilweise oder totale Pankreasresektion.

Neuere Untersuchungen zeigten zudem, dass auch Mutationen der Kurzketten-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (SCHAD) zu PHHI führen kann (Molven et al. 2004).

Mäuse die in B-Zellen kein FOXA-2 mehr exprimieren, zeigen einen Phänotyp der an PHHI erinnert. Foxa2 ist ein wichtiger Regulator der SUR1-,  $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ - und SCHAD-Gene. Somit käme auch eine Störung von Foxa-2 als Ursache für PHHI in Betracht (Lantz und Kästner 2005).

Unlängst wurde über 4 PHHI-Patienten berichtet, die keine Mutation in den bisher bekannten Genen aufweisen (Tornovsky et al. 2004). Dies bedeutet, dass weitere Kandidatengene für die Erkrankung in Frage kommen müssen.

## 1.8 $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-defiziente Mäuse

Die Möglichkeit, ein einzelnes Gen in einem Organismus gezielt auszuschalten, eröffnet interessante Perspektiven für die Forschung. Ein Mausmodell, dem der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal in der Membran der B-Zelle fehlt, eignet sich zum besseren Verständnis der B-Zell-Regulation, da  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle eine wichtige Rolle in der Stimulus-Sekretions-Kopplung spielen.

Ein  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-defizientes Mausmodell kann auf verschiedene Weise kreiert werden. Der  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal besteht aus einer regulatorischen und einer porenbildenden UE. Beide UEs werden benötigt, damit der Kanal in die Membran eingebaut wird. Daher kann man entweder im SUR1-Gen oder im  $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ -Gen eine Deletion herbeiführen, die zu einer  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-defizienten Maus führt.

Es wurde sowohl die eine als auch die andere Strategie gewählt, so dass wir heute sowohl über ein SUR1<sup>-/-</sup>- als auch über ein  $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ <sup>-/-</sup>-Modell verfügen. Ersteres wurde von der Arbeitsgruppe um Lydia Aguilar-Bryan und Joseph Bryan in Houston kreiert (Seghers et al. 2000). Sie tauschten das Exon 2 im Gen für SUR1 durch eine

Pyromycinresistenzkassette aus. Dadurch wird SUR1 nicht exprimiert und die B-Zellen haben keine  $K_{ATP}$ -Kanäle. Bereits zwei Jahre zuvor entstand die  $K_{ir}6.2^{-/-}$  Maus (Miki et al. 1998).

Die homozygoten Knockoutmäuse beider Modelle sind lebensfähig und vermehren sich normal. Überraschenderweise zeigen sie keine Anzeichen von PHHI wie zu erwarten wäre. Sie sezernieren weder übermäßige Mengen an Insulin noch sind sie permanent hypoglykämisch. Das bedeutet, der humane Phänotyp, der bei Mutationen im SUR1 oder  $K_{ir}6.2$  auftritt, findet sich bei der Maus nicht.

Inseln aus  $SUR1^{-/-}$  Mäusen sezernieren signifikant weniger Insulin nach Glucosestimulus als Inseln aus WT Tieren.  $SUR1^{-/-}$  Mäuse haben daher eine leicht erhöhte Blutglucosekonzentration nach oralem bzw. intraperitonealem Glucosetoleranztest, zeigen aber nach 120 Minuten, dem klinisch relevanten Wert, keinen Unterschied zum WT und sind zudem nicht insulinhypersensitiv. Interessanterweise zeigen Inseln aus  $SUR1^{-/-}$  Mäuse nach Fasten signifikant niedrigere Blutglucosekonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Seghers et al 2000). Dieser Effekt konnte bei den  $K_{ir}6.2^{-/-}$ -Tieren nicht beobachtet werden (Miki et al. 1998). Shiota et al. (2002) berichten ebenfalls von verminderter Glucosetoleranz bei gleichzeitig geringerer Insulinsekretion nach 16h Fasten im Glucosetoleranztest. Darüber hinaus sezernieren die  $SUR1^{-/-}$ -Mäuse nach Injektion einer 46%igen Glucoselösung signifikant weniger Insulin als Kontrolltiere (Shiota et al. 2002).

Inseln aus  $K_{ir}6.2^{-/-}$  Mäuse sezernieren in 2,8 mM Glucose ebenso wenig Insulin wie Kontrollinseln, reagieren aber unter 16,7 mM Glucose nicht mit einer gesteigerten Insulinsekretion. Dies wurde in Versuchen mit steady-state-Inkubation sowie auch an perfundierten Inseln gezeigt.

Die Blutglucosekonzentration im gefütterten Zustand unterscheidet sich nicht vom WT, wobei nach Fasten in  $K_{ir}6.2^{-/-}$  Mäusen eine etwas geringere Blutglucosekonzentration gefunden wurde.

Während die Verteilung der B-Zellen in den Langerhans-Inseln dem WT entsprechen, finden sich die A-Zellen der  $K_{ir}6.2^{-/-}$ -Mäuse nicht nur in der Peripherie der Inseln sondern auch im Inneren. (Miki et al. 1998).  $K_{ir}6.2$  bildet auch in Skelettmuskelzellen, Herzmuskelzellen und Zellen der glatten Muskulatur zusammen mit SUR2  $K_{ATP}$ -Kanäle.  $K_{ir}6.2^{-/-}$  Mäuse zeigen in vitro und in vivo eine verbesserte Glucoseaufnahme in Skelettmuskelzellen nach Stimulation mit Insulin (Miki et al. 2002a).

Für meine Untersuchungen habe ich die  $SUR1^{-/-}$  Maus eingesetzt, die unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von L. Aguilar-Bryan und J. Bryan überlassen wurde.

## 1.9 Fragestellung

Die Bedeutung des  $K_{ATP}$ -Kanals für die Stimulus-Sekretions-Kopplung in pankreatischen B-Zellen ist ausführlich belegt worden (Mislser et al. 1992, Henquin 2000).

Er gilt als Bindeglied, um das metabolische Glucosesignal über die elektrische Aktivität auf die intrazelluläre Calciumkonzentration und damit letztlich auf die Sekretion zu übertragen. Der  $K_{ATP}$ -Strom sorgt für ein stabiles Ruhemembranpotential der B-Zelle und verhindert so eine übermäßige Insulinsekretion. Mutationen in Genen, die für den  $K_{ATP}$ -Kanal kodieren, führen beim Mensch zu schweren Stoffwechselstörungen aufgrund des Funktionsverlustes der Kanäle.

Die  $SUR1^{-/-}$ -Maus hingegen ist in der Lage den schweren Gendefekt zu kompensieren. Es ist ihr möglich, auf einen Glucosereiz adäquate Mengen Insulin zu sezernieren, um so ihre Glucosehomöostase zu gewährleisten. Daher ist die  $SUR1^{-/-}$ -Maus ein ideales Modell um  $K_{ATP}$ -Kanal unabhängige Insulinsekretion der B-Zelle zu untersuchen. Mit ihrer Hilfe kann man neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der B-Zelle erlangen und so zum besseren Verständnis der Regulation dieses Zelltyps beitragen.

Für die Entwicklung neuer wirksamer Medikamente gegen Stoffwechselerkrankungen, die einer gestörten B-Zell-Regulation zugrunde liegen (z.B. Diabetes und Hyperinsulinismus), ist es von großer Bedeutung neue Erkenntnisse auf dem Gebiet der B-Zell-Regulation zu erlangen.

Die folgenden Zielsetzungen lagen dieser Arbeit zugrunde:

1. Untersuchungen zur Stimulus-Sekretions-Kopplung in B-Zellen ohne  $K_{ATP}$ -Kanäle. Insbesondere sollte geklärt werden, ob der Glucosemetabolismus noch an die elektrische Aktivität gekoppelt ist und darüber hinaus zu Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration führt, wodurch die Insulinsekretion gesteuert werden kann.
2. Für WT B-Zellen wurde gezeigt, dass durch Veränderungen in der extrazellulären Calciumkonzentration bzw. Beeinflussung der intrazellulären Calciumspeicher sich die Calciumhomöostase und damit die Insulinsekretion beeinflussen lässt. Untersuchungen an B-Zellen aus  $SUR1^{-/-}$  Mäusen sollten zeigen, ob diese Modulationen in B-Zellen ohne funktionsfähige  $K_{ATP}$ -Kanäle ebenfalls vorhanden sind und für die Regulation einer geregelten Insulinsekretion in  $K_{ATP}$ -Kanal-defizienten B-Zellen eine Rolle spielen.

3. Mitochondrien spielen neben der ATP-Synthese und damit der Übertragung des metabolischen Glucosesignals auf das Membranpotential (über  $K_{ATP}$ -Kanäle) auch bei den glucoseinduzierten Oszillationen der WT B-Zelle eine wichtige Rolle. Es sollte daher geklärt werden inwieweit sich der Knockout des  $K_{ATP}$ -Kanals auf die mitochondrielle Funktion der B-Zelle auswirkt.

## 2 Material

### 2.1 Versuchstiere

Es wurden SUR1<sup>-/-</sup> Mäuse (Eigenzucht) im Alter von 3-12 Monaten und C57/Bl6 Mäuse (Charles River, D) im Alter von 3-6 Monaten verwendet. Die Mäuse wurden in Makrolon-Käfigen in einem 12h/12h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten Standardtrockenfutter (Altromin, Lage/Lippe, D) und Trinkwasser ab libitum. Die Raumtemperatur betrug 24°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55-65%.

### 2.2 Geräte

#### 2.2.1 Zellkultur

- Brutschrank mit CO<sub>2</sub>-Regler
- Laminar-Flow-Box
- Petrischalen
- Wasserbad
- Stereolupe
- Vortex
- Zentrifuge
- B 5060 E, Heraeus, Hanau, D
- Heraeus, Hanau, D
- Falcon 35 x 10 mm, Becton Dickinson, USA
- Köttermann, Hänigsen, D
- Nikon, Japan
- Vortex-Genie, Wilton u. Co, NL
- Hettich Universal, Tuttlingen, D

#### 2.2.2 Messsystem für Calcium-Imaging

Mikroskop	Axiovert 100, Zeiss, Jena, D
Objektiv	PlanNeofluar 40x, Zeiss, Stuttgart, D
Mess-Software, Gitter, Monochromator	TILL photonics, Planegg, D
Auswertesoftware	Igor Pro 4.05A, WaveMetrics, USA
Tisch, schwingungsgedämpft	Eigenkonstruktion, Werkstatt, Pharmazeutisches Institut, Tübingen, D

---

Wasserbad	Eigenkonstruktion, Werkstatt, Pharmazeutisches Institut, Tübingen, D
Thermostat	Lauda, Lauda-Königshofen, D

### 2.2.3 Mikroelektrodenmesssystem

Elektrodenziehgerät	DMZ-Universalpuller, Zeitz-Instrumente, Augsburg, D
Faraday-Käfig	Eigenbau, Werkstatt, Pharmazeutisches Institut, Tübingen, D
Glaselektroden	GC150F-15, Clark, Pangbourne, UK
Mikromanipulator	Leitz
Binokular PZM	World Precision Instruments, Sarasota, FL USA
Oszilloskop	HM 305, HAMEG Instruments, Frankfurt, D
Flachbettschreiber BD11E	Kipp&Zonen B.V., NL
Tisch, vibrationsgedämpft Mod II	HWL bioanalytic systems, Herrenberg/Entringen, D
Verstärker	Eigenbau
Signalverteiler	Instrutech Incorp
Videobänder	EMTEC, Ludwigshafen, D
Videogerät M9021G	Telefunken,
Wasserbad	Eigenkonstruktion, Werkstatt, Pharmazeutisches Institut, Tübingen, D
Thermostat	Lauda, Lauda-Königshofen, D
Perifusionsapparatur	Eigenkonstruktion, Werkstatt, Pharmazeutisches Institut, Tübingen, D

## 2.3 Chemikalien

- Collagenase NB 8 aus *Clostridium histolyticum* 0,9 PZ-U/mg (SERVA, Boehringer Ingelheim, D)
- Fötale Kälberserum (GIBCO BRL, Eggenstein, D; Invitrogen, Karlsruhe, D)
- Penicillin (10000 IU/ml) – Streptomycin (10000 µg/ml) Lösung (GIBCO BRL, Eggenstein, D; Invitrogen, Karlsruhe, D)
- RPMI 1640 mit L-Glutamin (GIBCO BRL, Eggenstein, D; Invitrogen, Karlsruhe, D)
- Fura 2/AM, Fura-2 K-Salz (Molecular Probes, Eugene, USA)
- Guinea Pig Anti Rat Insulin Serum (BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, D)
- <sup>125</sup>Jod-Insulin, 740 kBq/ml A-14 (Hoechst, Frankfurt)
- Ratteninsulinstandard (Linco Research, St. Charles, MO)

Alle übrigen Chemikalien wurden in der reinsten, erhältlichen Form von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D; Roth, Karlsruhe, D; Merck, Darmstadt, D oder Merck Biosciences, Schwalbach, D bezogen.

## 2.4 Lösungen

Alle Chemikalien die zur Herstellung der nachfolgend aufgeführten Lösungen verwendet worden sind, wurden in demineralisiertem Wasser gelöst.

### 2.4.1 Präparierlösungen zur Isolierung der Langerhans-Inseln aus Mäusepankreas

	Lösung A	Lösung B
NaCl	135,00 mM	135,00 mM
KCl	5,60 mM	5,60 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,20 mM	1,20 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,28 mM	-
EGTA	-	1,00 mM
Glucose	3,00 mM	3,00 mM
HEPES	1,00 mM	10,00 mM
Penicillin/Streptomycin	1,00 % (V/V)	1,00 % (V/V)
BSA	0,10 % (m/m)	0,10 % (m/m)

Vor Zugabe von BSA wurde der pH mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Lösung A wurde bei 4°C, Lösung B bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

#### Kollagenaselösung:

In jeweils 1 ml Lösung A wurden 0,55 mg Kollagenase gelöst. Ca. 2,5 ml dieser Lösung wurden in eine 2 ml Einmalspritze aufgezogen und bis zur Verwendung auf Eis gekühlt, um den Aktivitätsverlust der Kollagenase zu minimieren.

### 2.4.2 Medium für B-Zell Kultur

RPMI1640 mit 10% (V/V) FKS und 1% (V/V) Penicillin/Streptomycin-Mix

Das Medium wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

### 2.4.3 Lösungen für Mikroelektrodenversuche

#### 2.4.3.1 Badlösung

NaCl	120,00 mM
KCl	5,00 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,20 mM
NaHCO <sub>3</sub>	24,00 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,50 mM

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt, danach wurde CaCl<sub>2</sub> zugegeben um ein Ausfällen von Calciumcarbonat zu verhindern.

Während der Versuche wurde die Lösung kontinuierlich mit Carbogen begast um den pH konstant bei 7,4 zu halten. Die Lösung wurde für die Versuche jeweils frisch hergestellt und mit der in den Versuchen angegebenen Menge an Glucose versetzt.

#### 2.4.3.2 Lösung für die Mikroelektrode

Es wurde eine zweimolare Kaliumcitratlösung und eine einmolare Kaliumchloridlösung im Verhältnis 1:1 gemischt und bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Vor Verwendung wurde die Lösung sterilfiltriert (0,22 µm) und mittels einer Kanüle für Periduralanästhesie in die Mikroelektrode eingebracht.

### 2.4.4 Badlösung für [Ca]<sub>c</sub>-Messungen

NaCl	140,00 mM
KCl	5,00 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,20 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,50 mM
HEPES	10,00 mM

Der pH-Wert der Lösung wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Vor Verwendung der Lösung wurde den Versuchen entsprechend die benötigte Menge an Glucose bzw. anderen zugegeben.

## 2.4.5 Lösungen für die Bestimmung der Insulinsekretion aus Langerhansinseln

### 2.4.5.1 Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

NaCl	122,00 mM
KCl	4,70 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,10 mM
HEPES	10,00 mM

Mit NaOH wurde der pH auf 7,4 eingestellt und danach 0,5% BSA zugegeben.

Dem KRH-Puffer wurden 5,6 mM Glucose zugesetzt um die Inseln aus dem Pankreas zu isolieren. Während der steady-state-Inkubationen wurde die Menge Glucose zugesetzt wie in den Versuchen angegeben.

### 2.4.5.2 Lösung für den Radioimmunoassay (RIA)

NaCl	9,00 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	12,35 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,65 g
EDTA	11,80 g
Thiomersal	0,10 g
Destilliertes Wasser	ad 1000,00 g

Mit NaOH wurde der pH auf 7,4 eingestellt und danach 1% BSA zugegeben.

Meerschweinchen-Antikörper gegen Ratteninsulin (Guinea Pig Anti Rat Insulin Serum)

Der Antikörper wurde in 1 ml Lösung für RIA (1 % BSA) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.4.5.3 Ratteninsulinstandard**

Das Insulin wurde in der notwendigen Menge KRH-Puffer gelöst, aliquotiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert (Endkonzentration 20 ng/ml).

### **2.4.5.4 Radioaktiv markiertes Jod**

Das <sup>125</sup>Jod-Insulin mit einer Aktivität von ca. 740 kBq wurde in 2 ml Aqua bidestillata gelöst und in Aliquots zu 200 µl (mit einer Aktivität von ca. 74 kBq) bei -20 C eingefroren. Diese Stammlösung wurde vor der Verwendung nochmals 1:80 verdünnt.

### 2.4.6 Stammlösungen

#### D 600 (Gallopamil)

Zur Herstellung einer 100 mM Stammlösung wurden 52,1 mg der Substanz in 1 ml absolutem Ethanol gelöst. Die Stammlösung wurde vor Versuchsbeginn mit der jeweiligen Badlösung auf 100  $\mu$ M verdünnt.

#### FCCP

Es wurde eine 10 mM Stammlösung in Aceton hergestellt, aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor Versuchsbeginn wurde diese mit der jeweiligen Badlösung auf 0,5  $\mu$ M verdünnt.

#### Tolbutamid

270 mg Substanz wurden in 1 ml 1 N NaOH gelöst. Durch Zugabe von 9 ml demineralisiertem Wasser erhielt man die Stammlösung (100 mM), die vor Versuchsbeginn mit der jeweiligen Badlösung auf 100  $\mu$ M verdünnt wurde.

#### Diazoxid

46,14 mg Substanz wurden in 0,1 N NaOH gelöst. Die Stammlösung (20 mM) wurde vor Versuchsbeginn auf 100  $\mu$ M in der jeweiligen Badlösung verdünnt.

#### Cyclopiazonsäure

Es wurde eine 20 mM Stammlösung in DMSO hergestellt, aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor Versuchsbeginn wurde diese mit der jeweiligen Badlösung auf 10  $\mu$ M verdünnt.

### 2.4.7 Weitere Lösungen

#### Tetraethylammoniumchlorid, Natriumazid und L-Arginin

Die Substanzen wurden direkt in der gewünschten Konzentration in der jeweiligen Badlösung gelöst.

#### Ouabain

0,058 mg Substanz wurden in 1 ml ca.  $90^{\circ}\text{C}$  heißem, demineralisiertem Wasser gelöst und zu 99 ml Badlösung gegeben, um eine Endkonzentration von 1 mM zu erhalten.

### 3 Methoden

#### 3.1 Präparation von Langerhans-Inseln aus Mäusen und Gewinnung von Einzelzellen zur Bestimmung von $[Ca]_c$

Zunächst wird die Maus mit Hilfe von  $CO_2$  getötet. Im Anschluss daran sprüht man das Fell großzügig mit Ethanol 70% ein. Unter Zuhilfenahme von sterilisiertem Präparationsbesteck hebt man das Fell mittels einer Pinzette an und schneidet es mit einer Präparierschere unterhalb der Rippenbögen ca. 1 cm ein. Um das Peritoneum freizulegen wird das Fell nun mit Hilfe zweier chirurgischer Pinzetten auseinander gezogen und angehoben. Anschließend eröffnet man den Bauchraum vorsichtig mit einer scharfen Schere, so dass die inneren Organe nun freiliegen.

Anschließend klemmt man den *Ductus choledochus* knapp unterhalb der Leber ab. Zusätzlich werden zwei weitere Klemmen am Duodenum ca. 5 cm rechts und links der *Papilla duodeni vateri* angebracht. Danach spritzt man mit Hilfe einer Kanüle (0.40\*20) langsam 2 ml eisgekühlte Kollagenaselösung in den *Ductus pancreaticus* ein. Dadurch bläht sich der Pankreas stark auf und kann nach Lösen der Klemmen mit Hilfe einer feinen Schere herauspräpariert werden.

Das Organ legt man nun in ein 10 ml Glasgefäß und inkubiert es bei  $37^\circ C$  in einem Schüttelwasserbad. Hierbei beträgt die Inkubationszeit bei Pankreata von C57/Bl6 Mäusen 11 min. und bei solchen aus SUR1<sup>-/-</sup> Mäusen 9,5 min.

Durch Zugabe von 10 ml gekühlter Lösung A wird der Verdauungsvorgang anschließend gestoppt. Das noch zusammenhängende Pankreasgewebe wird nun mit Hilfe einer Rekordspritze zerteilt und in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Unter Zuhilfenahme einer Handzentrifuge werden die freischwimmenden Inseln anschließend abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wird drei Mal wiederholt, um die Kollagenaselösung vollständig zu entfernen.

Die nun freiliegenden Inseln werden mit Hilfe einer gebogenen Pasteurpipette manuell aus einem Sammelgefäß ausgelesen und in ein 1,5 ml Eppendorffgefäß überführt.

Danach zentrifugiert man sie 2 min. bei 800 U/min und pipettiert den Überstand ab. In  $Ca^{2+}$  freier Präparierlösung B wird das Pellet nun resuspendiert und mit Hilfe eines Vortex gut gemischt. Die Inseln werden 10 min. in der Lösung belassen und erneut bei 800 U/min 2 min. zentrifugiert.

Unter einer Sterilwerkbank wird der Überstand anschließend entfernt. Um die Inseln in Einzelzellen bzw. Zellcluster zu zerteilen wird das Pellet in einigen Tropfen vorinkubiertem Medium resuspendiert und mit Hilfe einer rundgeschmolzenen Pipette 20-30 Mal auf- und abpipettiert. Von dieser Zellsuspension verteilt man nun zwei Tropfen auf je einem Zellkulturschälchen ( $\varnothing$  35 mm). Die Kulturschälchen stellt man nun ca. drei Stunden in den auf 37°C temperierten Brutschrank (95% O<sub>2</sub> / 5 %CO<sub>2</sub>). So können die Zellen absinken und anhaften. Im Anschluss daran wird die Zellschale mit 2 ml Medium vorsichtig aufgefüllt. Die Primärkultur kann so bis zu 4 Tage verwendet werden.

### 3.2 Fluoreszenzoptische Messung von $[Ca]_c$

Die Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_c$  wird mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes (Fura-2-Acetoxymethylester) nach der Methode von Grynkiewicz et al. (1985) durchgeführt. Fura-2 ist ein Calciumchelator der zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Die Anregungswelle für die freie Form beträgt 380 nm, für die an Calcium gebundene Form 340 nm. Eine Xenonlampe erzeugt monochromatisches Licht der gewünschten Wellenlänge. Dieses wird über ein optisches Gitter in den Lichtleiter gelenkt und über einen dichroitischen Spiegel (495 nm) in die Probe weitergeleitet. Das optische Gitter wird über eine Software gesteuert und sorgt dafür, dass die Probe abwechselnd für jeweils 20 ms mit den Wellenlängen bestrahlt wird. Die Probe ist in einer auf 37 °C temperierten Durchströmungskammer auf einem inversen Phasenkontrastmikroskop befestigt.

Das von der Probe emittierte Licht wird durch den dichroitischen Spiegel auf einen Longpass-Emissionsfilter (515 nm) gelenkt. Zur Quantifizierung der Calciumkonzentration wird der Quotient aus dem emittierten Licht der beiden Wellenlängen gebildet. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass Störeinflüsse, wie z.B. das Ausbleichen (Photobleaching) des Fluoreszenzfarbstoffes unterdrückt werden. Ebenso haben Konzentrationsunterschiede des Farbstoffes aufgrund der unterschiedlichen Dicke der Zellschicht keine Auswirkungen auf die Messung.

Zur Kalibrierung des Farbstoffes dient sein wasserlösliches Salz Kalium-Fura-2. Die Proben werden vor Versuchsbeginn mehrmals mit Badlösung für  $[Ca^{2+}]_c$ , das 15 mM Glucose enthält, gewaschen. Zu einem Milliliter Badlösung wird dann 5  $\mu$ M Fura-2 gegeben und die Zellen damit bei 37 °C für 35-45 min. im Dunklen inkubiert.

### **3.3 Steady-state-Inkubation zur Bestimmung der Insulinsekretion aus Langerhans-Inseln**

Die Langerhans-Inseln werden wie unter 3.1 beschrieben aus Mäusepankreas isoliert. Jedoch wird anstelle von Lösung A KRH-Puffer verwendet. Pro Ansatz werden fünf etwa gleich große Inseln in ein Polystyrolröhrchen pipettiert und mit 1 ml KRH-Puffer versetzt. Der Puffer enthält die jeweils nach Versuch gewünschte Menge Glucose bzw. die zu untersuchende Substanz. Pro Versuch stellt man 3-5 gleiche Ansätze her und inkubiert sie für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln. Zum Abstoppen der Reaktion werden die Röhrchen auf Eis gelegt, vom Überstand 500 µl in ein Eppendorfröhrchen pipettiert und bei -20 °C tiefgefroren.

### **3.4 Radioimmunoassay (RIA) zur Insulinbestimmung**

Das während der steady-state-Inkubation sezernierte Insulin wird mittels eines RIA bestimmt. Hierbei konkurriert das sezernierte Insulin mit radioaktiv markiertem Insulin um die Bindung an einem Meerschweinchenantikörper gegen Insulin. Aus dem Verhältnis des radioaktiv markierten zu dem unmarkierten Insulin lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln. Hierzu taut man die Proben auf und mischt sie mittels eines Vortex gut durch. Jeweils 100 µl werden in Polystyrolröhrchen pipettiert und mit 100 µl Lösung für RIA (BSA 0,5%) versetzt. Danach werden jeweils 100 µl <sup>125</sup>Jod-Insulin (Stammlösung 1:80 verdünnt) und 100 µl Ratteninsulinantikörper hinzugefügt, gut geschüttelt und bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag fügt man jeweils 1,5 ml Ethanol 96% hinzu um den Antigen-Antikörper-Komplex zu fällen. Das dabei entstandene Präzipitat wird abzentrifugiert (3800 U/min, 20 min, 4 °C). Der Überstand wird abgenommen und das Pellet mit Ethanol 80% gewaschen. Mittels eines Gamma-Counters kann nun die Radioaktivität des Pellet über einen Zeitraum von zwei Minuten vermessen werden. Anhand einer Standardverdünnungsreihe mit Ratteninsulinstandard wird eine Eichkurve erstellt, die man zur Berechnung der Insulinkonzentration in den Proben verwendet.

### **3.5 Mikroelektrodentchnik**

#### **3.5.1 Präparation einzelner Langerhans-Inseln zur Ableitung des Membranpotentials mit der Mikroelektrode**

Nachdem die Maus mit CO<sub>2</sub> getötet wurde, wird das Fell mit einer Pinzette in Höhe der Rippenbögen angehoben, mit einer Schere durchtrennt und mit Hilfe zweier chirurgischer Pinzetten auseinander gezogen. Nun hebt man die Bauchdecke an und durchtrennt sie ebenfalls, so dass die Organe freiliegen. Danach hebt man den Pankreas am Schwanz mit einer Pinzette an und präpariert das gesamte Organ mit einer feinen Schere aus dem Tier. Das Organ wird sofort in die Versuchsapparatur eingebracht, die bereits mit carbogenbegaster Badlösung, die 15 mM Glucose enthält, durchströmt wird. Mit Hilfe sehr feiner Pinzetten bewegt man den Pankreas nun unter Stereolupenbetrachtung hin und her, um eine günstige Stelle mit einer oder mehreren Langerhans-Inseln im Gewebe zu finden. Durch Feststecken des Gewebes mit Präpariernadeln und durch Wegschneiden des umliegenden Gewebes erhält man ein kleines Stück exokrines Gewebe, in das eine oder mehrere Langerhans-Inseln eingebettet sind. Dieses wird nun weiter aufgespannt, so dass ein Teil der Insel im Gewebe eingebettet bleibt und lediglich ein kleines Stück der Insel aus dem Gewebe herausragt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Insel nicht berührt wird, um Verletzungen zu vermeiden. Das umliegende Gewebe sollte straff gespannt sein. Nicht benötigtes Gewebe wird in einem kleinen Becherglas, in dem sich begaste Badlösung mit 15 mM Glucose befindet, aufgehoben. So können nötigenfalls erneut Inseln präpariert werden. Das Ersatzgewebe wird maximal 2,5 h aufbewahrt.

#### **3.5.2 Aufbau der Messapparatur**

Abb. 3.1. stellt die Messapparatur für die Mikroelektrodenversuche dar. Den zentralen Bestandteil bildet die Perifusionskammer (6). Im Vordergrund ist das Binokular (2) mit der Lichtquelle (7) zu sehen. Für die Präparation der Inseln und die Positionierung der Mikroelektrode über der Insel ist eine adäquate Vergrößerung und eine gute Ausleuchtung unerlässlich. Rechts neben der Lichtquelle befindet sich der Mikromanipulator (1), an dem die Mikroelektroden befestigt werden und den man in alle drei Raumrichtungen bewegen kann. Am linken oberen Rand erkennt man den Heizblock aus Aluminium mit den Vorratsgefäßen (3), der mittels einer

Durchströmungsanlage (nicht dargestellt) beheizt wird. An die Vorratsgefäße angeschlossen sind die Zuläufe zum Sechs-Wege-Hahn (5), die zunächst durch ein Heizgefäß (4) geführt werden.

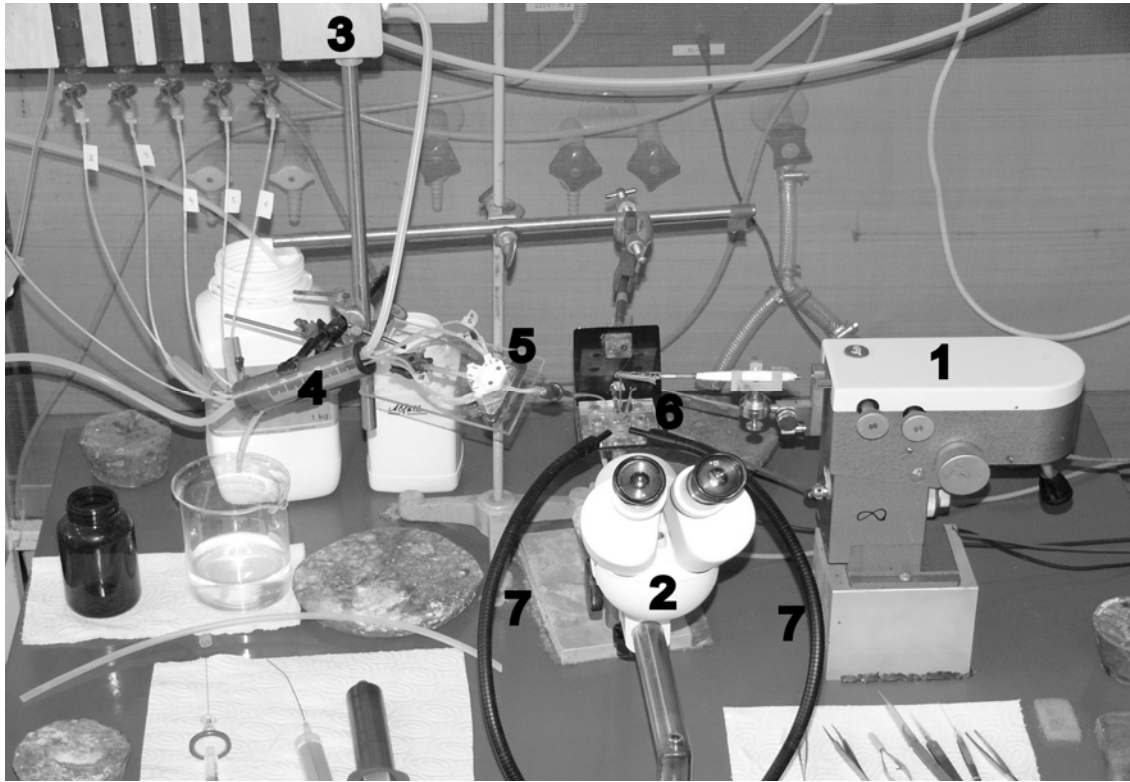


Abb. 3.1 Messplatz für Mikroelektrodenversuche: Mikromanipulator (1), Binokular (2), Vorratsgefäße für Lösungen in Alu-Heizblock vortemperiert (3), Heizgefäß für Lösungsschläuche (4), Sechs-Wege-Hahn (5), Perifusionskammer (6), Beleuchtung (7)

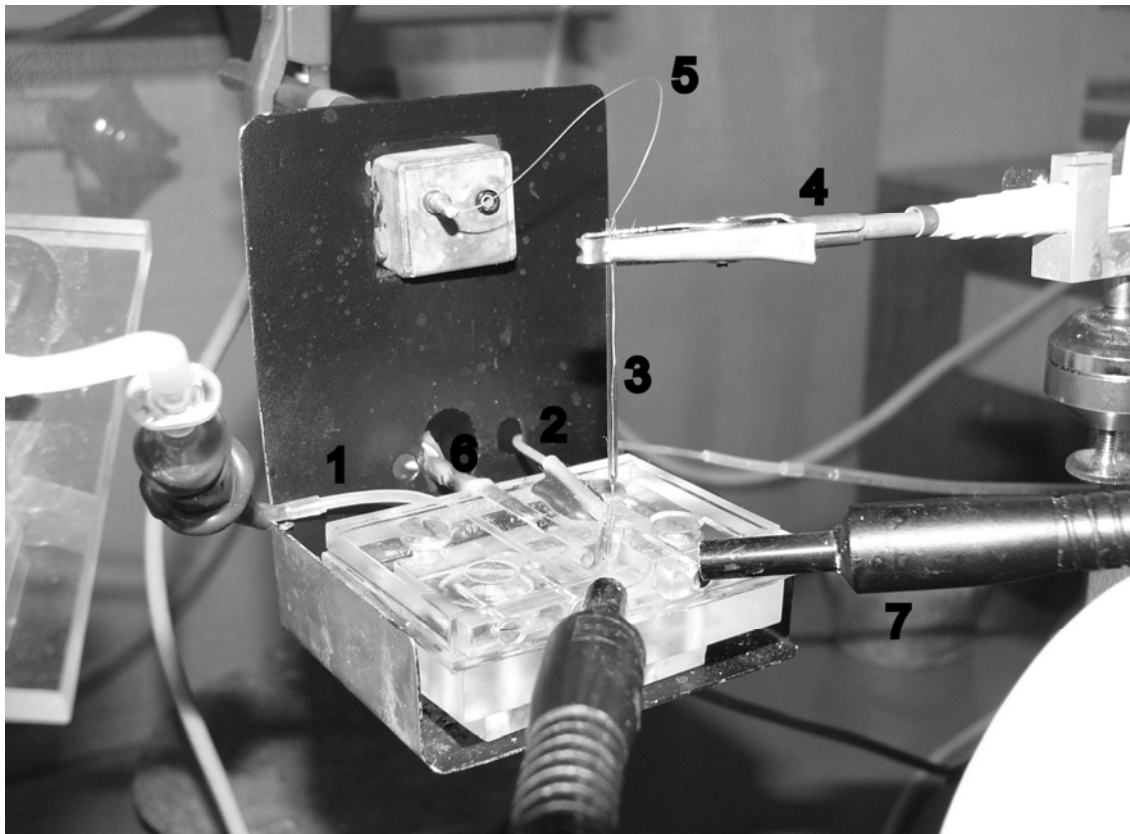


Abb. 3.2 Perifusionskammer: Zulauf (1), Ablauf (2), Mikroelektrode (3), Haltearm am Mikromanipulator (4), chlorierter Silberdraht (5), Erdelektrode (6) und Beleuchtung (7)

### 3.5.2.1 Perifusionsanlage

Das Perifusionssystem (Abb. 3.2) ist der zentrale Bestandteil des Messstandes. Es besteht aus einer Perifusionskammer, in die über einen Verteiler, den Sechs-Wege-Hahn (Abb. 3.3), die auf 37°C temperierten Lösungen einströmen. Der Verteiler ermöglicht einen schnellen Wechsel der Lösungen. Die Lösungen in den Vorratsbehältern werden konstant mit Carbogen (O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5%) begast und auf ca. 40°C temperiert. Die Durchflussrate beträgt ca. 10 ml pro Minute. Zwischen dem Verteilerhahn und der Perifusionskammer ist ein Luftblasensammler zwischengeschaltet. Würden Luftblasen durch die Perifusionskammer treiben, so könnten sie die Mikroelektrode bewegen und diese würde dadurch aus der Zelle springen. Eine störungsfreie Messung wäre so nicht möglich. Über eine elektrische Pumpe wird die Lösung am anderen Ende der Perifusionskammer durch ein Schlauchsystem in ein Sammelgefäß geleitet. In der Perifusionskammer wird das Pankreasstück auf einer Halbkugel, über die zuvor PVC-Folie gespannt wird, eingebracht. Hier werden die Langerhans-Inseln präpariert.

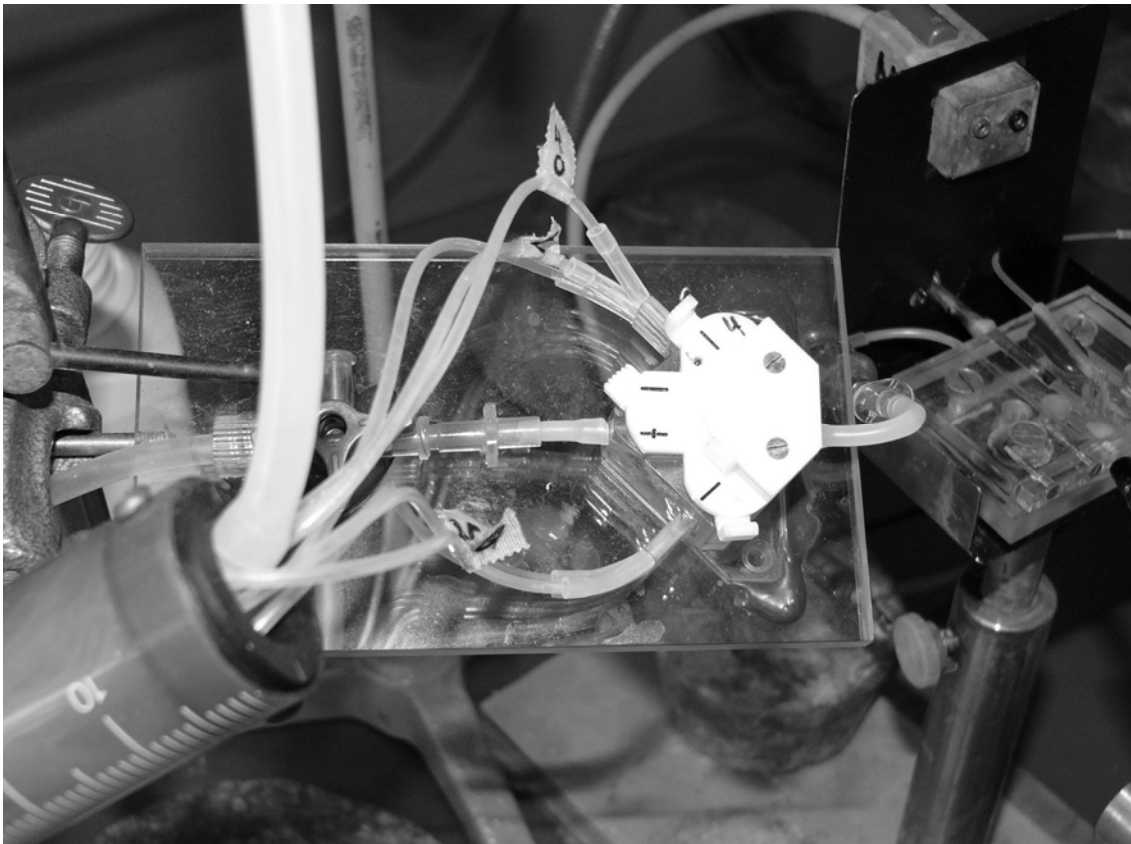


Abb. 3.3 Darstellung des Sechs-Wege-Hahns der Perifusionsapparatur

### 3.5.2.2 Elektroden

Mit Hilfe eines DMZ-Universalpullers werden die Mikroelektroden am Versuchstag jeweils neu aus Glaselektroden (GC150F-15) gezogen. Eine Mikroelektrode hat im Gegensatz zu Glaselektroden für Patch-clamp-Versuche eine sehr fein ausgezogene, elastische Spitze mit einem Durchmesser von ca. 500 nm. Dadurch wird gewährleistet, dass sich diese beim Durchtritt durch die Plasmamembran idealerweise wieder eng um die Elektrode schließt und so kein Leckstrom entsteht. Der Widerstand der Elektroden zu Versuchsbeginn liegt bei 80-120 M $\Omega$ , gemessen in der Badlösung. Die eigentliche Messelektrode ist ein chlorierter Silberdraht, der mit dem Vorverstärker verbunden ist. Der Silberdraht wird am Versuchstag mit 1N HCl frisch chloriert. Dies gewährleistet eine störungsfreie Ableitung der elektrischen Aktivität.

Eine Kaliumcitrat/Kaliumchlorid-Lösung (Verhältnis 1:1) wird blasenfrei in die Glaselektrode gefüllt. Sie dient als Salzbrücke zwischen Intrazellularraum und chloriertem Silberdraht.

Die Erdelektrode wird direkt in der Perifusionskammer positioniert und ist mit dem Differenzverstärker verbunden.

### **3.5.2.3 Messgeräte und Datensicherung**

Das bei der Messung abgeleitete elektrische Signal wird im Differenzverstärker um den Faktor zehn verstärkt. Am nachgeschalteten Signalverteiler sind der Schreiber, das Oszilloskop und ein Videorecorder angeschlossen. Ein Mikrofonanschluss ermöglicht das Aufsprechen aller wichtigen Ereignisse, wie z.B. das Wechseln der Badlösung während der Messung, direkt auf Videoband.

Zur Auswertung und Darstellung der Ergebnisse werden die Versuche eingespielt und auf einem Schnellschreiber (Fa. Gould) dargestellt.

### **3.5.3 Versuchsdurchführung**

Bei der Mikroelektrodenteknik handelt es sich um eine Methode, mit deren Hilfe das intrazelluläre Membranpotential von Zellen abgeleitet werden kann. B-Zellen kommen in Langerhans-Inseln als funktionelle Verbände zusammen mit Alpha-, Delta- und PP-Zellen vor. Diese Inseln sind im exokrinen Gewebe eingebettet. Durch die Präparation erhält man die gesamte Insel zusammen mit einem Stück exokrinen Gewebes. Dadurch wird weitestgehend eine in-vivo-Situation simuliert. Sticht man nun mit der Mikroelektrode in die Insel und dort in eine B-Zelle ein, so kann man das Membranpotential der einzelnen Zelle in ihrem funktionellen Verband studieren. Ableitungen des Membranpotentials der B-Zelle wurden auf diese Weise zum ersten Mal 1968 von Dean und Matthews publiziert.

Um in eine B-Zelle einzustechen wird die Elektrode mit Mikroelektroden-Lösung befüllt und am Mikromanipulator befestigt. In die Flüssigkeit wird ein chlorierter Silberdraht eingebracht. Nun senkt man die Spitze der Elektrode unter Stereolupenbetrachtung langsam bis auf wenige Millimeter über eine Langerhans-Insel ab. Mit Blick auf das Oszilloskop wird die Elektrode nun sehr vorsichtig und langsam weiter abgesenkt, bis ein Ausschlag am Oszilloskop den Eintritt der Elektrode in die Insel anzeigt. In den seltensten Fällen erreicht man einen Einstich in eine B-Zelle lediglich durch Herunterfahren auf die Insel. Daher muss nun durch vorsichtiges Klopfen am Mikromanipulator und dadurch ausgelöste Schwingung der Elektrode, versucht werden, diese in eine B-Zelle einzustechen. Ein erfolgreicher Einstich in eine

Zelle wird durch einen Spannungssprung auf ca. -40 mV erkannt. Falls nach mehreren Klopfversuchen kein Einstich erfolgt, wird die Elektrode aus der Insel gezogen. Nun kann an einer neuen Stelle erneut ein Einstichversuch begonnen werden.

Oftmals dauert es längere Zeit, bis man einen erfolgreichen Einstich in eine B-Zelle erreicht.

Da man optisch nicht sehen kann, in welchen Zelltyp der Insel man eingestochen hat, bedarf es Kriterien zur Unterscheidung, bevor man einen Versuch starten kann. B-Zellen machen ca. 80% der Zellpopulation innerhalb der Langerhans-Insel aus. Daher ist es sehr wahrscheinlich beim Einstechen in eine Insel eine B-Zelle zu treffen. Die Einstiche erfolgen grundsätzlich in 15 mM Glucose. Bei dieser Konzentration sind A-Zellen elektrisch inaktiv. Lediglich B-Zellen zeigen hier ein charakteristisches elektrisches Muster, die slow waves (siehe Kap. 1.5.2). Leitet man also in 15 mM Glucose nach erfolgtem Einstich slow waves ab, so kann man sicher sein, dass man das Potential einer B-Zelle misst.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zur Glucoseabhängigkeit des Membranpotentials in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen

In WT B-Zellen ist  $V_m$  eng an die Glucosekonzentration gekoppelt: Bei substimulatorischer Glucosekonzentration ist  $V_m$  hyperpolarisiert und man kann das Ruhemembranpotential der B-Zelle messen. Dabei liegt die Schwelle, bei der die elektrische Aktivität beginnt bei ca. 5-7 mM Glucose. Bei höheren Glucosekonzentrationen kann man mit Hilfe der Mikroelektrodenteknik Oszillationen von  $V_m$  messen. Bei Konzentrationen über 20 mM ist die Zelle dauerdepolarisiert und man beobachtet kontinuierliche Spikeaktivität (Abb. 4.1A).

Da die Kopplung des Glucosestoffwechsels mit dem Membranpotential in WT B-Zellen über den  $K_{ATP}$ -Kanal erfolgt, stellte sich die Frage, über welche Mechanismen SUR1<sup>-/-</sup> Mäuse ihren Glucosestoffwechsel über die B-Zelle regulieren. Untersucht werden sollte, ob auch in B-Zellen von SUR1<sup>-/-</sup>-Mäusen das Membranpotential glucoseabhängig ist und somit eine  $K_{ATP}$ -Kanal unabhängige Kopplung vorliegt

Hierzu wurden zunächst Mikroelektrodenexperimente zur Bestimmung des Membranpotentials bei verschiedenen Glucosekonzentrationen durchgeführt. Wie aus Abbildung 4.1 (A) hervorgeht, erhöht sich mit ansteigender Glucosekonzentration die elektrische Aktivität einer WT B-Zelle ausgehend von substimulatorischer Glucosekonzentration (G3) und korrespondierendem Ruhemembranpotential über Oszillationen (G15) bis hin zur Dauerdepolarisation mit kontinuierlicher Spikeaktivität (G25).

Intakte Inseln aus SUR1<sup>-/-</sup> Mäusen hingegen zeigen Oszillationen des Membranpotentials von 0,5 bis 40 mM Glucose (Abb. 4.1 B-D). Die KO B-Zellen waren bei keiner Glucosekonzentration dauerhaft hyperpolarisiert, jedoch auch nie dauerdepolarisiert, was bei fehlenden  $K_{ATP}$ -Kanälen durchaus zu erwarten gewesen wäre.

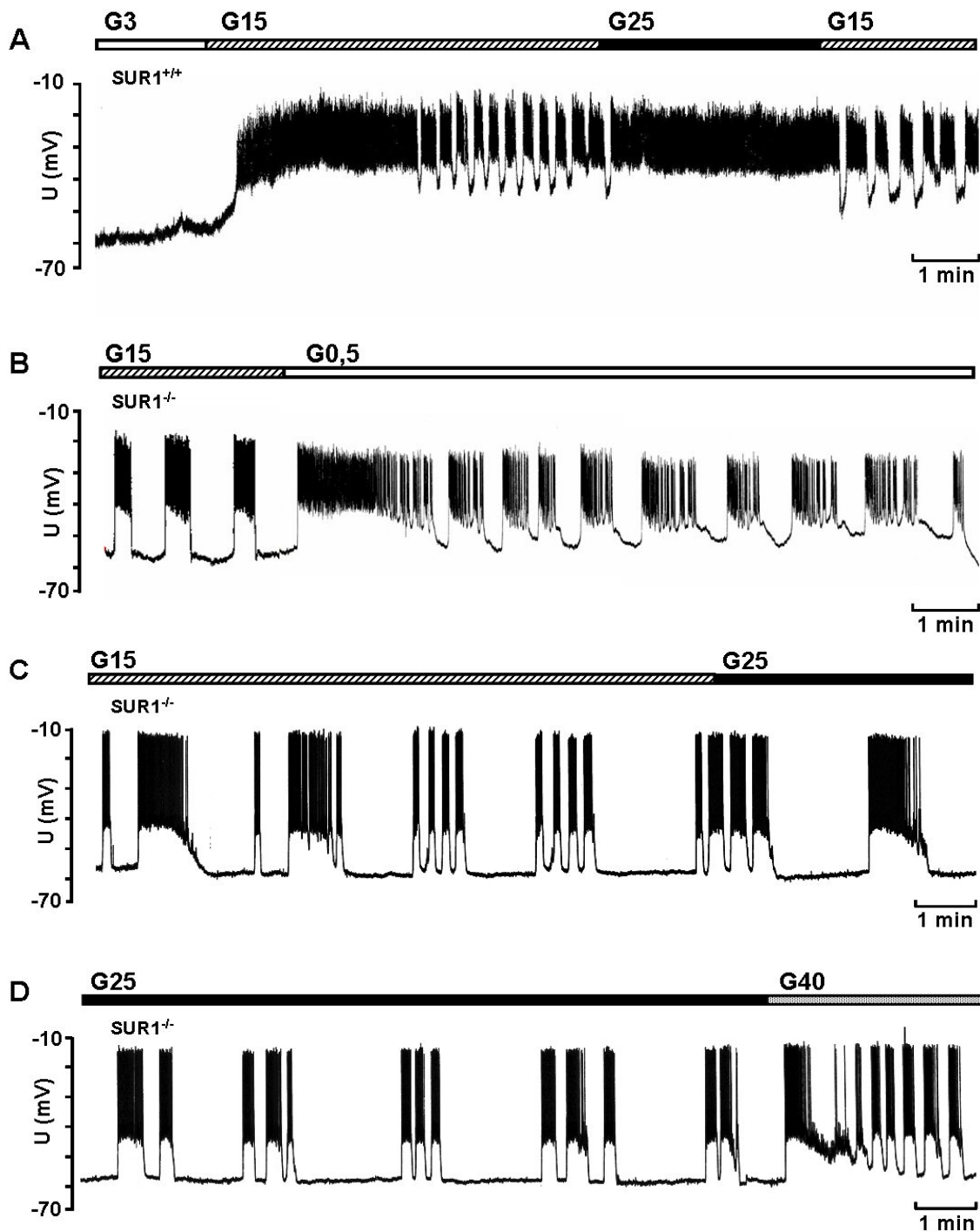


Abb. 4.1 Membranpotential gemessen mit der Mikroelektrode in intakten Langerhans-Inseln. (A) SUR1<sup>+/+</sup> Inseln aus C57Bl/6 Mäusen bei 0,5 mM, 15 mM und 25 mM Glucose. (B–D) Oszillationen in SUR1<sup>-/-</sup> Inseln bei 0,5 mM, 15 mM, 25 mM und 40 mM Glucose. Aufzeichnung (D) ist die direkte Fortsetzung von (C). Die Abbildung zeigt eine charakteristische Aufzeichnung aus drei (A), neun (B), acht (C) und vier (D) Experimenten.

Da die strenge Kopplung des Membranpotentials an den Glucosemetabolismus in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen nicht mehr in gleicher Weise wie in WT B-Zellen vorhanden ist, wurden die Oszillationen bei den verschiedenen Glucosekonzentrationen weiter analysiert. Dabei sind folgende Werte für die verschiedenen Glucosekonzentrationen ermittelt worden: mittlere Burst-Länge, mittlere Interburst-Länge, FOPP (fraction of plateau phase = prozentualer Anteil der depolarisierten Phasen des Membranpotentials mit Spikeaktivität) und Frequenz der Einzel-Aktionspotentiale für die ersten 10 Sekunden innerhalb der Burst-Phasen (Abb. 4.2).

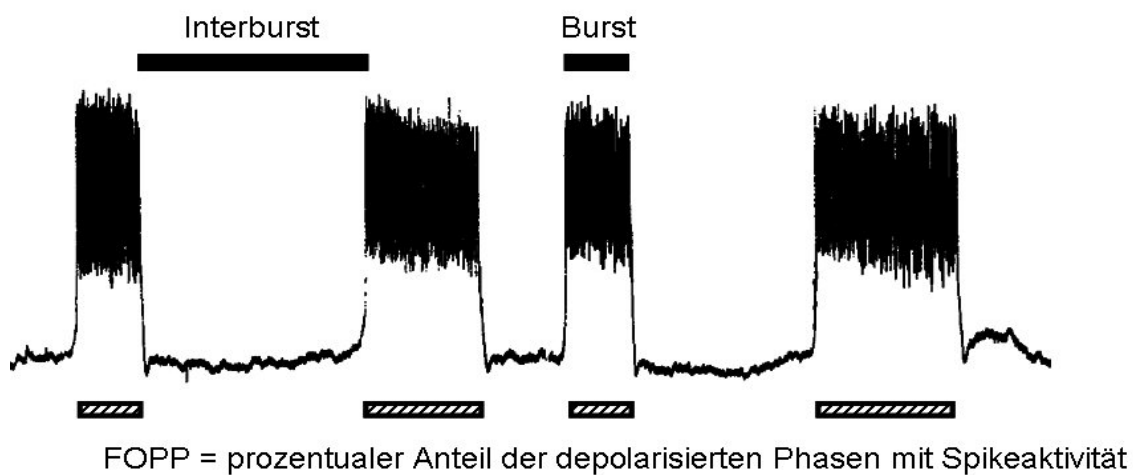


Abb. 4.2 Dargestellt ist die typische Ableitung des Membranpotentials einer SUR1<sup>-/-</sup> B-Zelle mit der Mikroelektrode in 15 mM Glucose. Burst: Phase in der  $V_m$  depolarisiert ist (Spikeaktivität). Interburst: Phase zwischen zwei Burst-Phasen (Hyperpolarisierte Phase). Prozentualer Anteil der depolarisierten Phasen: FOPP

Zunächst wurde der Mittelwert für 15 mM Glucose berechnet und dieser Wert als 100% Referenz bestimmt. Danach wurden die Einzelwerte der anderen Glucosekonzentrationen gemittelt und prozentual gegen 15 mM Glucose verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab 4.1 zusammengefasst.

Glucosekonzentration [mM]	0,5	25	40
Aktionspotentialfrequenz	67±3 <sup>b</sup>	134±11 <sup>a</sup>	150±27 <sup>a</sup>
mittlere Burst-Länge	195±27 <sup>a</sup>	164±27 <sup>a</sup>	102±15
mittlere Interburst-Länge	80±9	201±34	59±22
FOPP	170±12 <sup>b</sup>	97±7	178±41

[% gegen 15 mM Glucose]

n=9                  n=5-8                  n=4

Tab. 4.1 Effekte verschiedener Glucosekonzentrationen auf die Aktionspotentialfrequenz, mittlere Burst- und Interburst-Länge sowie den prozentualen Anteil der depolarisierten Phasen des Membranpotentials mit Spikeaktivität in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen. Die Werte sind dargestellt als mittlere prozentuale Veränderung ± SEM gegen 15 mM Glucose. <sup>a</sup>P≤0,05; <sup>b</sup>P≤0,001

Die Auswertung der Experimente zeigt, dass in B-Zellen, die keine K<sub>ATP</sub>-Kanäle besitzen, V<sub>m</sub> durch Glucose moduliert wird:

Erhöht man die Glucosekonzentration von 0,5 über 15, 25 bis hin zu 40 mM, kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Aktionspotentialfrequenz während der ersten 10 s innerhalb der Burst-Phasen.

Bei der Länge der gemittelten Interburst-Phasen lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Die mittlere Burst-Länge nimmt sowohl bei Absenken (G0,5) als auch bei Erhöhen (G25) der Glucosekonzentration zu. Bei Erhöhen der Glucosekonzentration von G15 auf G40 kann jedoch kein Unterschied mehr in der Burst-Länge festgestellt werden.

Der Anteil der depolarisierten Phasen mit Spikeaktivität (FOPP) wurde lediglich durch Absenken der Glucosekonzentration von 15 auf 0,5 mM signifikant erhöht. Ein Erhöhen der Glucosekonzentration von 15 auf 25 bzw. 40 mM führte nicht zu einer statistisch relevanten Veränderung der FOPP.

Die strenge Kopplung der Glucosekonzentration an die elektrische Aktivität, wie sie in WT B-Zellen vorliegt, ist demnach in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen nicht mehr zu finden.

## 4.2 Einfluß von $K_{ATP}$ -Kanal sensitiven Pharmaka auf das Membranpotential in $SUR1^{-/-}$ B-Zellen

Um eine Existenz von funktionellen  $K_{ATP}$ -Kanäle in der Plasmamembran von  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen ausschließen zu können, wurde der Einfluss von  $K_{ATP}$ -Kanal sensitiven Pharmaka auf das Membranpotential in  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen untersucht.

Sulfonylharnstoffe wie Tolbutamid wirken als direkte Agonisten am  $K_{ATP}$ -Kanal, während Diazoxid als Antagonist fungiert. In WT B-Zellen führt Tolbutamid in der Konzentration von 100  $\mu$ M durch Schließen der  $K_{ATP}$ -Kanäle zu einer Dauerdepolarisation im Membranpotential. Bei Zugabe von Diazoxid ab 50  $\mu$ M kommt es bei stimulatorischer Glucosekonzentration (G15) hingegen zu einem sofortigen Beenden der Oszillationen und einer Hyperpolarisation in  $V_m$  (Gilon und Henquin 1992).

In  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen zeigen beide Substanzen keine Auswirkungen auf das Membranpotential (Abb. 4.3). Damit kann klar gezeigt werden, dass in den verwendeten B-Zellen aus den KO-Tieren tatsächlich keine funktionellen  $K_{ATP}$ -Kanäle in der Plasmamembran existieren. Weiterhin zeigt es, dass beide Substanzen ihre Wirkung auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion lediglich über den  $K_{ATP}$ -Kanal ausüben. Sollte es also noch weitere Angriffspunkte für die Substanzen in B-Zellen geben, so sind diese höchstwahrscheinlich für die elektrische Aktivität und damit auch für die Insulinsekretion ohne Bedeutung.

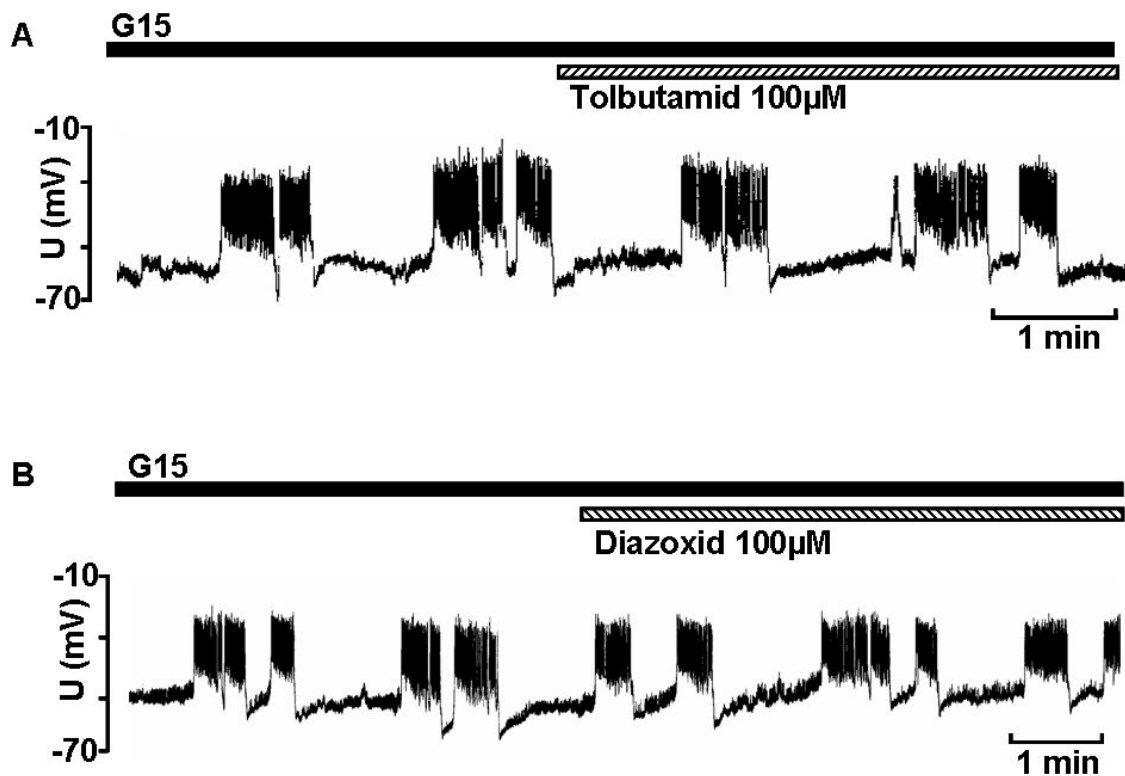


Abb. 4.3 Dargestellt ist das Membranpotential von SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen in 15 mM Glucose, gemessen mit der Mikroelektrode in intakten SUR1<sup>-/-</sup> Inseln. Effekt von Tolbutamid 100 μM (A, n=9) und Diazoxid 100 μM (B, n=7).

### 4.3 Untersuchung zur Kopplung von Membranpotential, intrazellulärer Calciumkonzentration und Insulinsekretion

Für WT B-Zellen konnte eine enge Kopplung zwischen  $V_m$  und  $[Ca^{2+}]_c$  gezeigt werden (Santos et al. 1991, Gilon et al. 1993, vgl. Kap. 1.5.1 und 1.5.4). Hierbei spielt das rhythmische Öffnen und Schließen der  $K_{ATP}$ -Kanäle eine entscheidende Rolle. Durch den gesteigerten Glucosemetabolismus nach Erhöhen der Glucosekonzentration kommt es zur Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten. Daraufhin schließen  $K_{ATP}$ -Kanäle und die Plasmamembran depolarisiert, worauf L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle öffnen und  $[Ca^{2+}]_c$  ansteigt. Ein verstärkter intrazellulärer Calciumeinstrom führt nun zu einem Anstieg in  $[Ca^{2+}]_m$  und zu einer Depolarisation in  $\Delta\Psi$ . Dadurch wird die ATP-Synthese unterbrochen und der ATP/ADP-Quotient ändert sich zugunsten von ADP. Es kommt zum Öffnen der  $K_{ATP}$ -Kanäle. Die Plasmamembran hyperpolarisiert und die Calciumkanäle schließen sich. Hierdurch sinkt  $[Ca^{2+}]_c$  und damit auch  $[Ca^{2+}]_m$  ab und die ATP-Synthese steigt schließlich wieder an.

Da die Insulinsekretion von  $[Ca^{2+}]_c$  abhängt, ist die Kopplung zwischen der elektrischen Aktivität, die das metabolische Glucosesignal auf das Membranpotential überträgt, und  $[Ca^{2+}]_c$  für eine geregelte Insulinsekretion der B-Zelle von großer Bedeutung.

Die Beobachtung, dass  $V_m$  (Abb. 4.1) und  $[Ca^{2+}]_c$  (Shiota et al. 2002, Doliba et al. 2004, Düfer et al. 2004, Nenquin et al. 2004) in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen oszillieren, führt zu der Frage, inwieweit in diesen Zellen eine intrazelluläre Kopplung zwischen  $V_m$ ,  $[Ca^{2+}]_c$  und der Insulinsekretion noch vorhanden ist.

Hierzu wurden die Zellen durch Erhöhen der extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mM auf 30 mM bzw. durch Zugabe von L-Arginin (10 mM) in Anwesenheit von 15 mM Glucose depolarisiert und die Auswirkung auf  $V_m$ ,  $[Ca^{2+}]_c$  und die Insulinsekretion untersucht.

Eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 30 mM (Hoch-Kalium) führt zu einer Depolarisation der Plasmamembran durch Veränderung des Nernst-Potentials. L-Arginin gelangt über spezielle Transporter in die B-Zelle und depolarisiert diese durch seine positive Ladung.

Sowohl die Zugabe von Hoch-Kalium als auch von L-Arginin führt zu einer sofortigen und dauerhaften Depolarisation in  $V_m$ , die mit Hilfe der Mikroelektrode gemessen werden kann (Abb. 4.4 A bzw. C). Während die Spikeaktivität unter Hoch-Kalium nach kurzer Zeit zum Erliegen kommt, kann bei L-Arginin eine kontinuierliche Spikeaktivität beobachtet werden.

Die FOPP steigt im Mittel von  $44 \pm 6\%$  auf 100% nach Zugabe von L-Arginin ( $P \leq 0,01$ ;  $n=4$ ) und von  $37 \pm 4\%$  auf 100% nach Erhöhen der extrazellulären Kaliumkonzentration ( $P \leq 0,001$ ;  $n=5$ ).

In weiteren Experimenten wurde  $[Ca^{2+}]_c$  fluoreszenzoptisch bestimmt (Abb. 4.4 B und D).  $[Ca^{2+}]_c$  oszilliert unter 15 mM Glucose zwischen  $378 \pm 31$  nM und  $66 \pm 8$  nM ( $n=11$ ). Nach Zugabe von L-Arginin (10 mM) oder Erhöhen der extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mM auf 30 mM hören die Oszillationen sofort auf und es kommt zu einem zweiphasigen Verlauf:  $[Ca^{2+}]_c$  steigt initial rasch an und sinkt nach Erreichen eines Höchstpunktes auf ein Plateau ab. Nach Zugabe von L-Arginin (10 mM) erhöht sich  $[Ca^{2+}]_c$  transient auf  $614 \pm 41$  nM und fällt dann auf ein Plateau von  $293 \pm 32$  nM ab ( $n=11$ ). Mit  $K^+$  (30 mM) erreicht  $[Ca^{2+}]_c$  transient einen Höchstwert von  $705 \pm 46$  nM und sinkt danach auf ein Plateau von  $339 \pm 20$  nM ab ( $n=10$ ). Nach Auswaschen der depolarisierenden Substanzen fällt  $[Ca^{2+}]_c$  sofort auf basale Werte ab und oszilliert danach erneut.

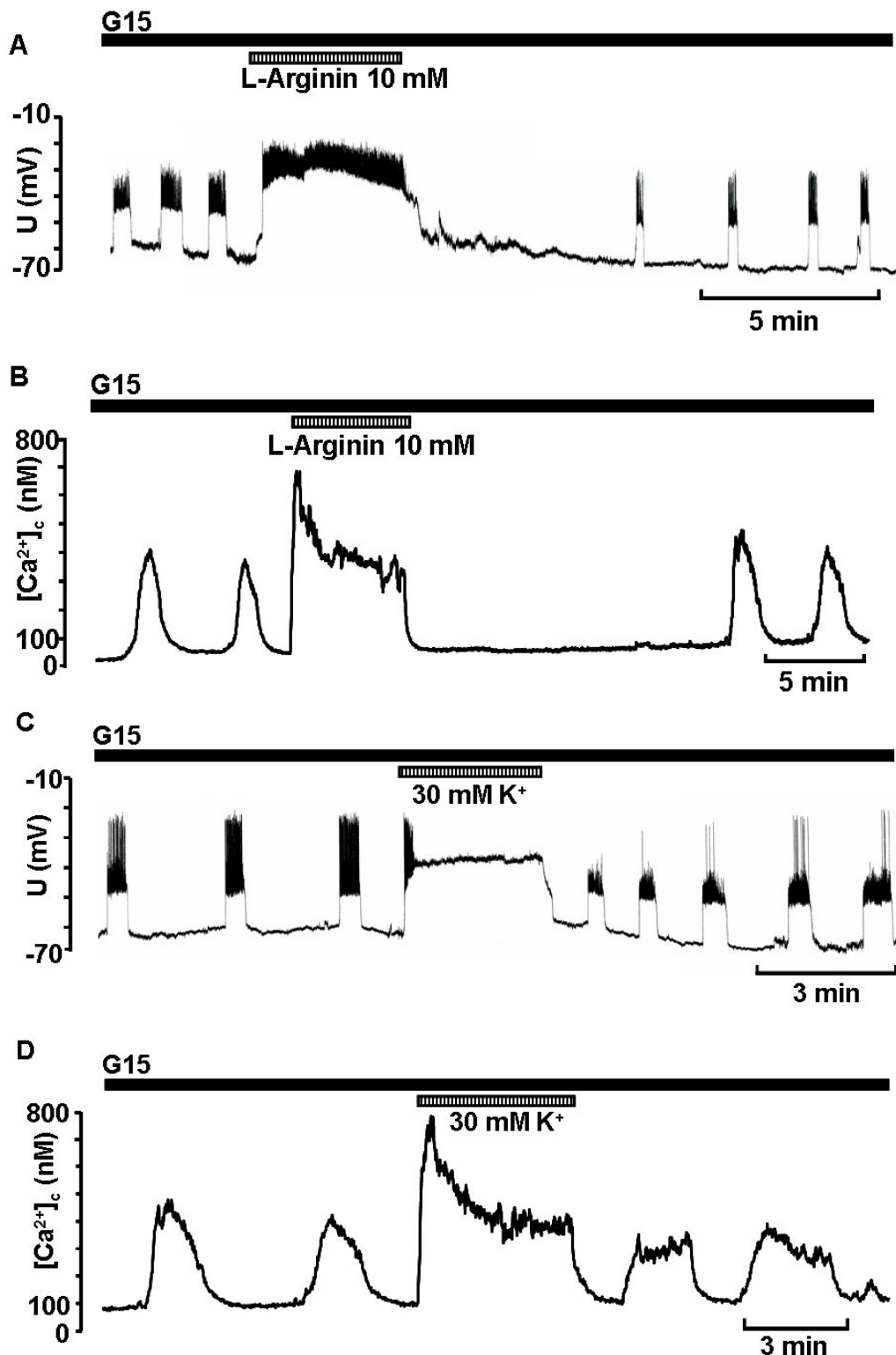


Abb. 4.4 Dargestellt ist die Kopplung zwischen  $V_m$  und  $[Ca^{2+}]_c$  in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen bei Depolarisation mit L-Arginin 10 mM (A,B) bzw. Erhöhen der extrazellulären Kaliumkonzentration von 5 mM auf 30 mM (C,D). Das Membranpotential (A,C) wurde mit intrazellulären Mikroelektroden gemessen, die intrazelluläre Calciumkonzentration (B,D) wurde fluoreszenzoptisch bestimmt. n=4 (A); 11 (B); 5 (C); 10 (D)

Weiterhin wurden Insulinsekretionsmessungen durchgeführt, um zu zeigen, ob die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration während der depolarisierten Phasen auch zu einer erhöhten Insulinsekretion führt.

Hierzu wurden jeweils 5 Inseln mit L-Arginin (10 mM) bzw. Hoch-Kalium (30 mM) in 15 mM Glucose inkubiert.

Die dabei sezernierte Insulinmenge konnte nun mit Hilfe des Radioimmunoassay bestimmt werden.

Abb. 4.5 zeigt, dass nach Zugabe von L-Arginin (10 mM), bzw. nach Erhöhen der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 30 mM, die Insulinsekretion von  $0,48 \pm 0,06 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$  in G15 auf  $1,10 \pm 0,14 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$  (L-Arginin,  $n=5$ ) bzw.  $1,02 \pm 0,10 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$  ( $\text{K}^+$  30 mM,  $n=6$ ) ansteigt.

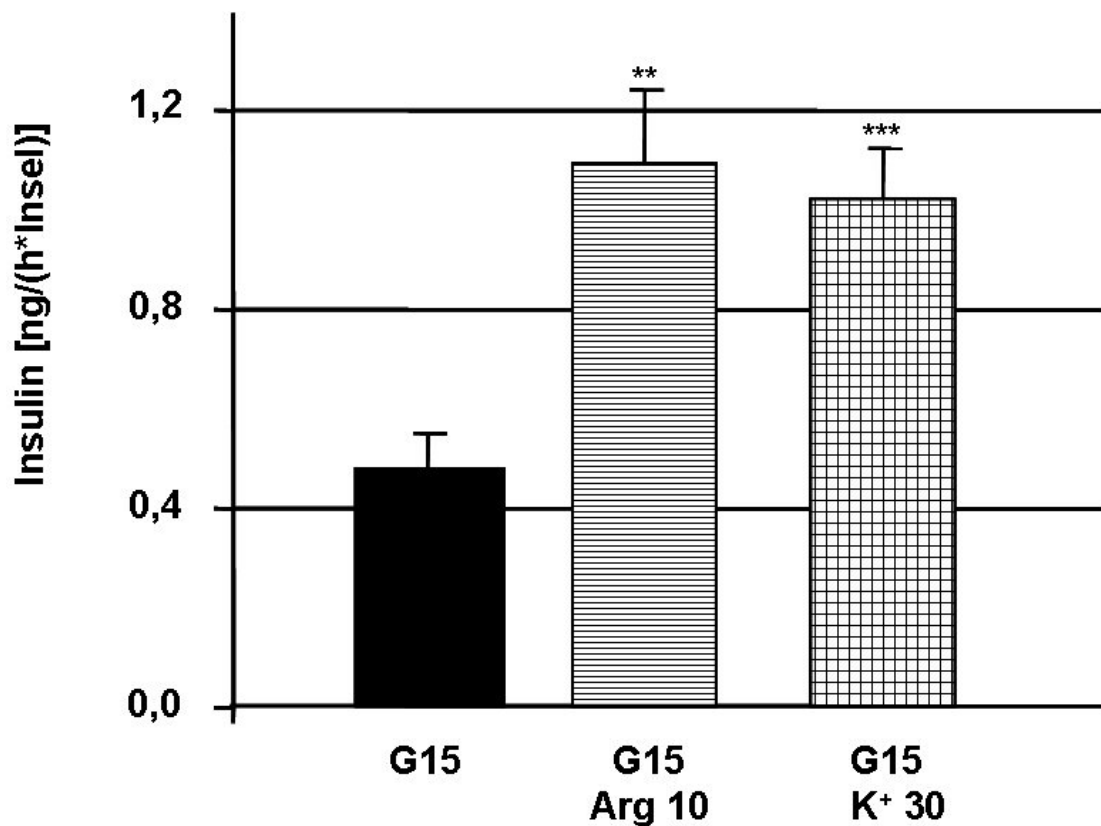


Abb 4.5 Insulinsekretion isolierter SUR1<sup>-/-</sup> Inseln in G15 im Vergleich zu verschiedenen, die Plasmamembran depolarisierenden, Substanzen (L-Arginin 10 mM;  $\text{K}^+$  30 mM).

Ansätze von fünf Inseln wurden mit der angegebenen Glucosekonzentration bzw. den jeweiligen Substanzen in den angezeigten Konzentrationen für 1 Stunde einer steady-state-Inkubation unterzogen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die mit \* gekennzeichneten Werte sind zu 15 mM Glucose signifikant unterschiedlich. \*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\* $P \leq 0,001$

Eine Kopplung zwischen  $V_m$ ,  $[Ca^{2+}]_c$  und Insulinsekretion lässt sich demnach auch in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen nachweisen. Daher wurde weiter untersucht ob die Modulationen in  $V_m$  (in Abhängigkeit der Glucosekonzentration) zu Veränderungen in der Insulinsekretion in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen führt.

Abb. 4.6 zeigt, dass die Erhöhung der Glucosekonzentration von 0,5 mM bis zu 40 mM zu einer Steigerung der Insulinsekretion führt. Die Insulinsekretion in 0,5 und 3 mM Glucose ist signifikant niedriger als unter 15 mM (G0,5:  $0,23 \pm 0,05 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ , n=6; G3:  $0,24 \pm 0,06 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ , n=5; G15:  $0,48 \pm 0,06 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ , n=6).

Die Inkubation mit 25 mM bzw. 40 mM Glucose steigert die Insulinfreisetzung im Vergleich zu G15 auf  $0,67 \pm 0,08 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$  (n=5) bzw.  $0,74 \pm 0,11 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$  (n=5).

Die Ergebnisse legen nahe, dass auch in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen, Veränderungen der Glucosekonzentration, über Modulationen in  $V_m$ , auf  $[Ca^{2+}]_c$  und auf die Insulinsekretion übertragen werden können. Demnach existiert in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen ein  $K_{ATP}$ -Kanal unabhängiger triggering pathway.

Dies wird durch Blutzuckerbestimmungen an gefütterten Tieren bestätigt. Diese zeigen, dass SUR1<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren keine erhöhten Blutglucosespiegel haben (Abb. 4.7). Hierbei liegt die Blutglucosekonzentration bei gefütterten WT Tieren bei  $7,9 \pm 0,2 \text{ nM}$  (n=8) im Vergleich zu  $8,1 \pm 0,4 \text{ nM}$  bei den SUR1<sup>-/-</sup> Tieren (n.s.; n=8).

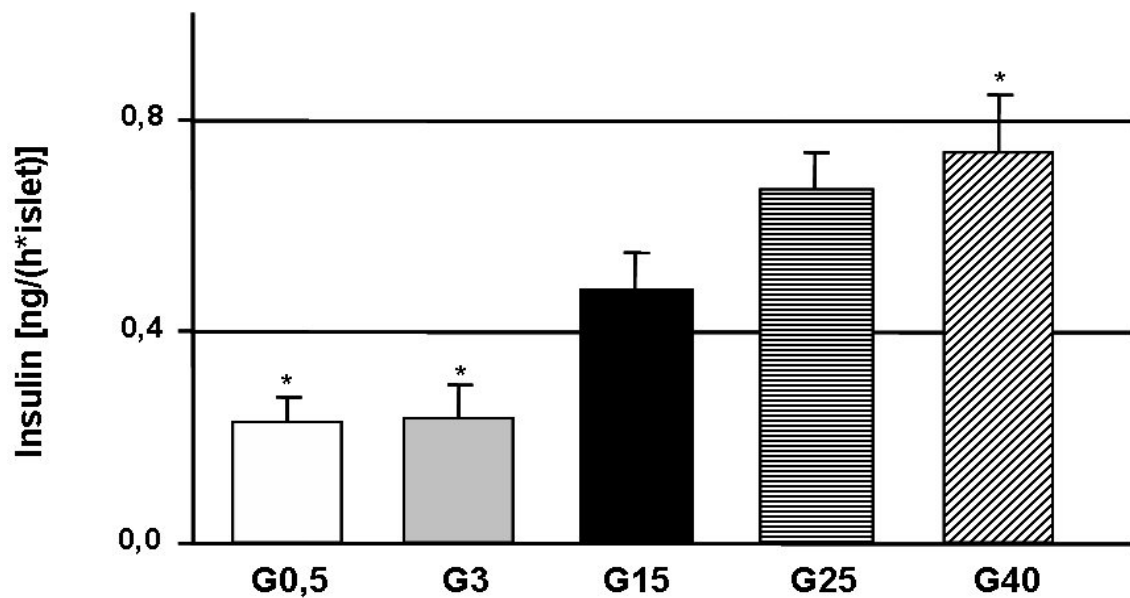


Abb. 4.6 Insulinsekretion isolierter SUR1<sup>-/-</sup> Inseln mit verschiedenen Glucosekonzentrationen (n=5-6).

Ansätze von fünf Inseln wurden mit der angegebenen Glucosekonzentration bzw. den jeweiligen Substanzen in den angezeigten Konzentrationen für 1 Stunde einer steady-state-Inkubation unterzogen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die mit \* gekennzeichneten Werte sind zu 15 mM Glucose signifikant unterschiedlich. \* $P \leq 0,05$

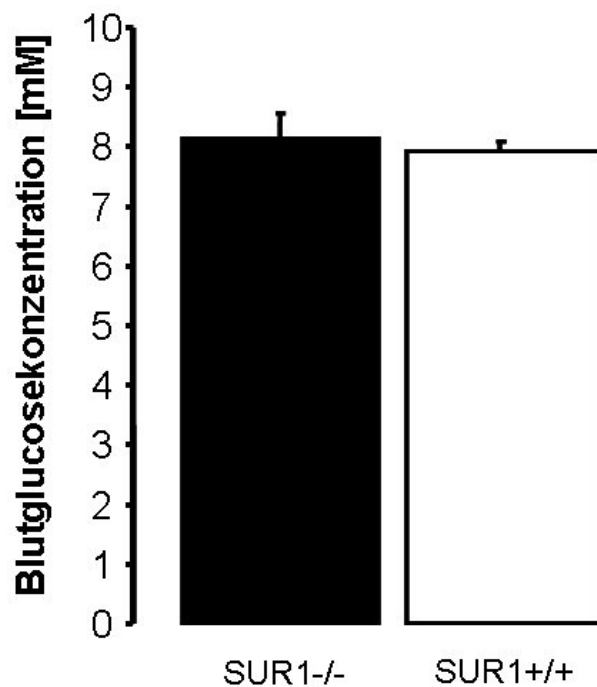


Abb. 4.7 Dargestellt ist die Blutglucosekonzentration gefütterter SUR1<sup>-/-</sup> bzw. WT Tiere (n=8).

Zur Bestimmung der Blutglucosekonzentration wurde den Tieren an der Schwanzvene Blut entnommen und mit einem handelsüblichen Blutzuckermessgerät (OneTouchUltra, Lifescan) die Blutglucosekonzentration bestimmt



#### 4.4 Beeinflussung des Membranpotentials durch Veränderung der extrazellulären Calciumkonzentration

In WT B-Zellen werden die Membranpotentialoszillationen durch rhythmische Veränderungen in der Offenwahrscheinlichkeit der  $K_{ATP}$ -Kanäle gesteuert (Krippeit-Drews et al. 2000; Rolland et al. 2002). Veränderungen der extrazellulären Calciumkonzentration beeinflussen auch die intrazelluläre Calciumkonzentration. So konnte gezeigt werden, dass durch Veränderung der extrazellulären Calciumkonzentration die Oszillationen in  $V_m$  beeinflusst werden (Gilon und Henquin 1992, Rosario et al. 1993).

In  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen ist  $[Ca^{2+}]_c$  an das Membranpotential gekoppelt (siehe Kap. 4.3). Ob  $[Ca^{2+}]_c$  in  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen seinerseits auch  $V_m$  beeinflusst und somit auf das Membranpotential rückkoppelt, wurde mit Hilfe der Mikroelektrode untersucht.

Abbildung 4.8 zeigt, dass sich durch Erhöhen der extrazellulären Calciumkonzentration von 2,5 auf 10 mM das Oszillationsmuster verändert. Die FOPP sinkt von  $32 \pm 3\%$  auf  $23 \pm 4\%$  ( $P \leq 0,05$ ;  $n=11$ ). Die mittlere Burst-Länge ist nicht unterschiedlich, während die Interburst-Länge von  $62 \pm 7$  s auf  $143 \pm 29$  s ansteigt ( $P \leq 0,05$ ;  $n=11$ ). Eine Erklärung für die Zunahme der Interburst-Phasen könnte die Aktivierung eines hyperpolarisierenden Stromes sein. Es ist anzunehmen, dass durch die erhöhte extrazelluläre Calciumkonzentration auch der Calciumeinstrom über die Plasmamembran zunimmt. Eine Aktivierung membranständiger  $K(Ca^{2+})$ -Kanäle könnte zu den verlängerten Interburst-Phasen führen.

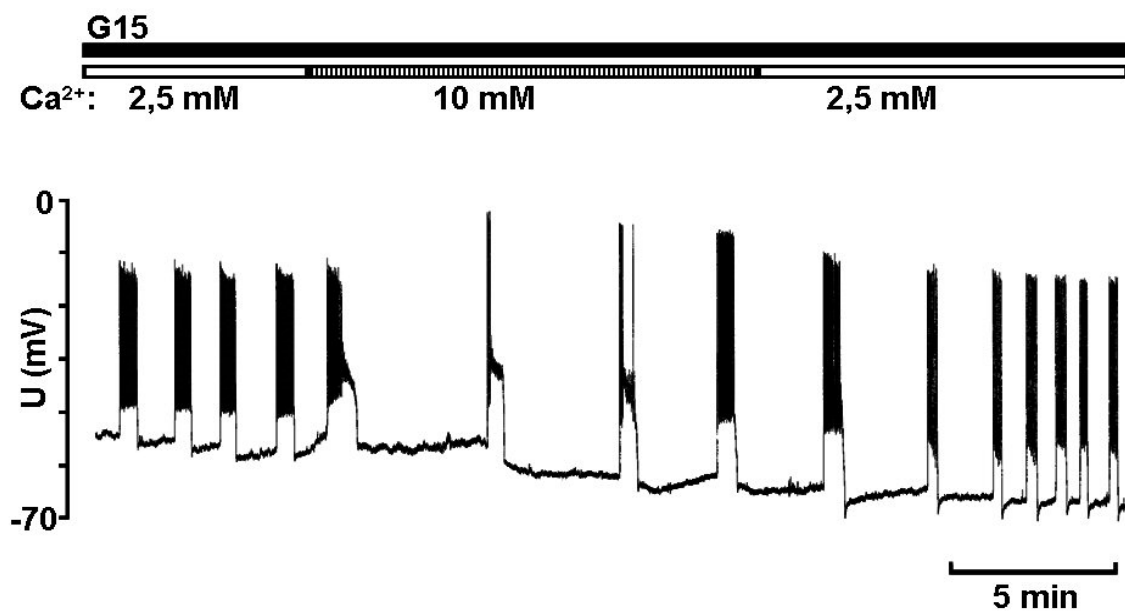


Abb. 4.8 Dargestellt ist die Auswirkung einer Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentrationen (2,5 mM auf 10 mM) auf das Membranpotential einer SUR1<sup>-/-</sup> B-Zelle, gemessen mit der Mikroelektrode in einer intakten Langerhans-Insel (n=11).

## **4.5 Veränderungen in $V_m$ , $[Ca^{2+}]_c$ und Insulinsekretion, durch Beeinflussung intrazellulärer Calciumspeicher in B-Zellen aus SUR1<sup>-/-</sup>-Mäusen**

### **4.5.1 Veränderungen in $V_m$ durch Hemmung der Calciumspeicherung in das ER**

Für WT B-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Calcium in das ER sowie die Freisetzung von Calcium aus dem ER  $V_m$  beeinflussen kann (Worley et al. 1994b; Arredouani et al. 2002). Calcium wird ATP abhängig über die SERCAs in das ER gepumpt und dient so als Hauptcalciumspeicher, um die Calciumhomöostase in der Zelle zu gewährleisten.

Cyclopiazonsäure hemmt die SERCAs spezifisch und reversibel (Goeger et al. 1988, Seidler et al. 1989). Dadurch wird eine Aufnahme von Calcium in das ER verhindert und Calcium wird aus dem ER über IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (Berridge 1993) ins Cytoplasma freigesetzt. Damit läuft der Calciumspeicher mit der Zeit leer.

Es ist anzunehmen, dass neben den IP<sub>3</sub>-Rezeptoren auch Ryanodinrezeptoren für die Freisetzung von Calcium ins Cytoplasma verantwortlich sind. Ihre Existenz in B-Zellen ist bereits nachgewiesen worden (Islam et al. 1998, Holz et al. 1999, Varadi und Rutter 2002, Beauvois et al. 2004) jedoch wird ihre physiologische Funktion noch kontrovers diskutiert (Cancela und Petersen 2002, Beauvois et al. 2004, Johnson et al. 2004).

Mit Hilfe der Mikroelektrodenteknik wurde untersucht, welche Auswirkung eine gehemmte Calciumspeicherung in das ER auf  $V_m$  in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen hat.

Hierzu wird  $V_m$  in G15 abgeleitet und dann Cyclopiazonsäure (10  $\mu$ M) hingefügt (Abb. 4.9). Dabei kann eine signifikante Zunahme der Oszillationsfrequenz von  $0,5 \pm 0,02$  Bursts/min in G15 auf  $1,1 \pm 0,07$  Bursts/min unter CPA (10  $\mu$ M) beobachtet werden ( $P \leq 0,001$ ,  $n=5$ ). Die Länge der Interburst-Phasen nimmt von  $73 \pm 9$  s in G15 auf  $24 \pm 4$  s unter CPA ab ( $P \leq 0,01$ ,  $n=5$ ). Die FOPP steigt dabei von  $44 \pm 7\%$  in G15 auf  $58 \pm 5\%$  unter CPA ( $P \leq 0,05$ ,  $n=5$ ).

Die Hemmung der SERCAs führt zu einer Entleerung des ERs. Dadurch kommt es in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen zu einer verstärkten Depolarisation in  $V_m$ . Auslöser für die zunehmende Depolarisation könnte die Induktion eines depolarisierenden Stromes sein.

Dieser müsste dem hyperpolarisierenden Strom, der die Interburst-Phasen regelt, entgegenwirken.

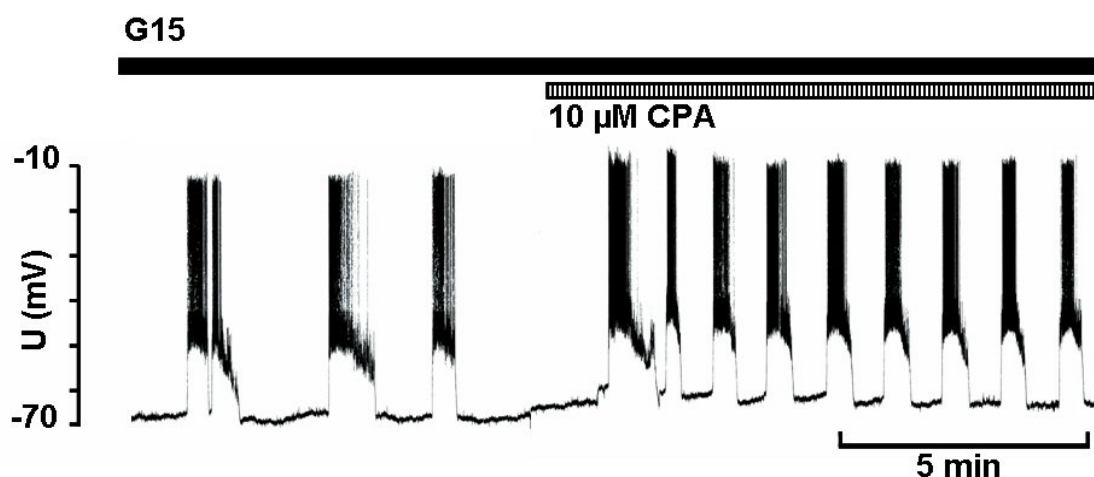


Abb. 4.9 Auswirkung von CPA (10 $\mu$ M) auf  $V_m$  in SUR1<sup>-/-</sup> Inseln. Dargestellt ist ein typisches Mikroelektrodenexperiment (n=5).

#### 4.5.2 Einfluss von CPA auf $[Ca^{2+}]_c$ und Insulinsekretion in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen

Um den Einfluss von CPA auf  $[Ca^{2+}]_c$  in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen zu untersuchen, wurden isolierte Zellcluster aus Langerhans-Inseln der SUR1<sup>-/-</sup> Mäuse fluoreszenzoptisch vermessen. Unter 15 mM Glucose kommt es zu Oszillationen in  $[Ca^{2+}]_c$ , die auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden (Shiota et al. 2002, Doliba et al. 2004, Nenquin et al. 2004, Düfer et al. 2004). CPA (10  $\mu$ M) verursacht einen Anstieg in  $[Ca^{2+}]_c$  (Abb. 4.10).

Um den Effekt besser quantifizieren zu können, wurde die „Area under the curve“ (AUC) der letzten fünf Minuten vor Wechseln der Badlösung verglichen. Dabei steigt die AUC von  $7455 \pm 556$  nM\*min unter G15 auf  $11351 \pm 704$  nM\*min nach Zugabe von CPA (10  $\mu$ M) ( $P \leq 0,01$ ; n=12). Dies entspricht einem Anstieg von 52% in  $[Ca^{2+}]_c$ , gegenüber dem Wert in G15.

Die Versuche in Kap. 4.3 zeigen, dass  $[Ca^{2+}]_c$  durch  $V_m$  gesteuert wird. Daher ist anzunehmen, dass die CPA-induzierte Erhöhung in  $[Ca^{2+}]_c$  durch die verstärkte Depolarisation in  $V_m$  (Abb. 4.9) zustande kommt.

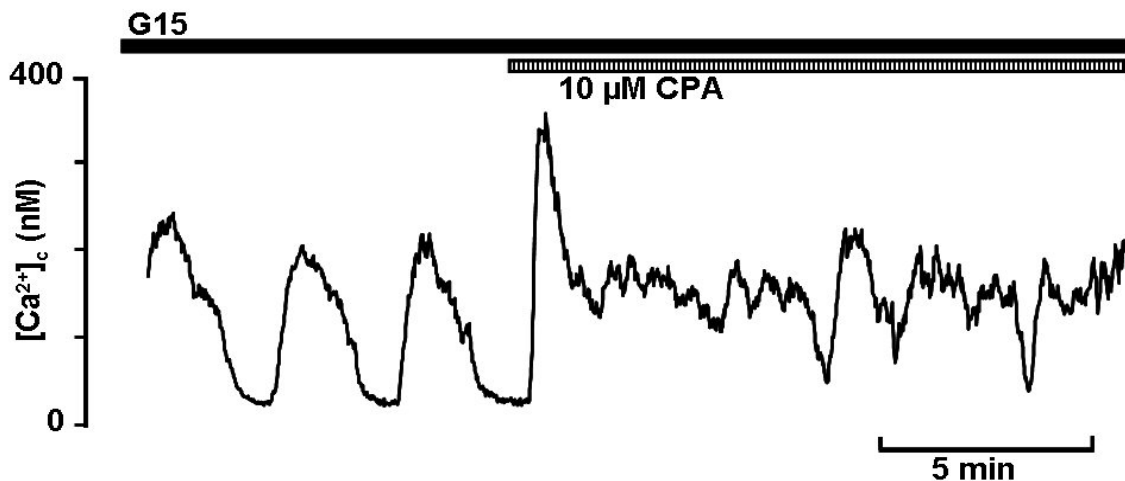


Abb. 4.10 Dargestellt ist der Effekt von CPA (10 $\mu$ M), in 15 mM Glucose, auf  $[Ca^{2+}]_c$  in SUR1 $^{-/-}$  B-Zellen.  $[Ca^{2+}]_c$  wurde fluoreszenzoptisch bestimmt (n=12).

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von CPA auf die Insulinsekretion in SUR1 $^{-/-}$  B-Zellen getestet.

Hierbei wurden jeweils fünf Inseln aus SUR1 $^{-/-}$  Mäusen einer steady-state Inkubation unterzogen. Dabei wurde die Insulinsekretion bei G0,5 und G15 sowie bei G15 plus CPA (10 $\mu$ M) mittels Radioimmunoassay bestimmt. Abb. 4.11 zeigt die Zunahme der Insulinsekretion von  $0,183 \pm 0,063 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$  in G0,5 auf  $0,45 \pm 0,14 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$  in G15. Durch Zugabe von CPA (10  $\mu$ M) in G15 kommt es zu einer weiteren Steigerung der Insulinsekretion auf  $0,63 \pm 0,17 \text{ ng} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Insel}^{-1}$ .

Es konnte also gezeigt werden, dass durch die Hemmung der Calciumaufnahme in das ER ein depolarisierender Strom induziert wird, der zu einer Erhöhung in  $[Ca^{2+}]_c$  und somit auch in der Insulinsekretion führt.

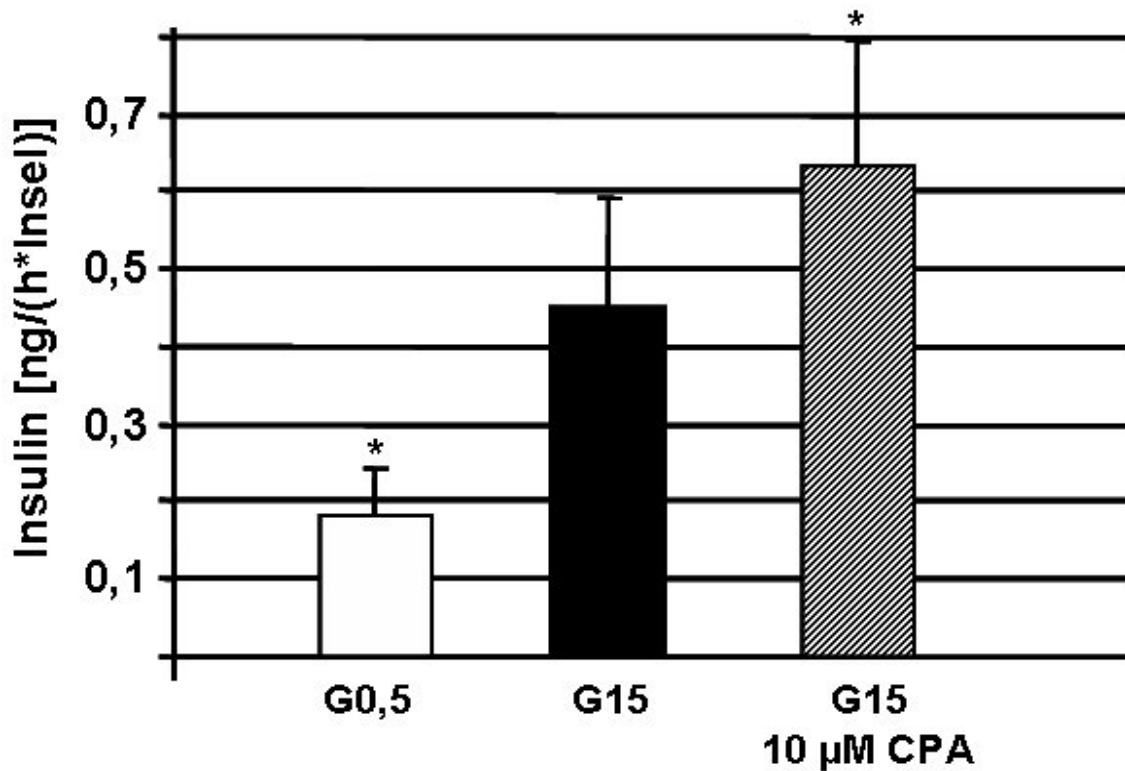


Abb. 4.11 Insulinsekretion isolierter SUR1<sup>-/-</sup> Inseln mit 0,5 und 15 mM Glucose bzw. nach Zugabe von CPA 10µM in 15 mM Glucose (n=5 aus verschiedenen Präparationen).

Ansätze von fünf Inseln wurden mit der angegebenen Glucosekonzentration bzw. zusätzlich mit CPA (10µM) für 1 Stunde einer steady-state-Inkubation unterzogen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. Die mit \* gekennzeichneten Werte sind zu 15 mM Glucose signifikant unterschiedlich.  $P \leq 0,05$

### 4.5.3 Untersuchungen zum speicherinduzierten Calciumeinstrom in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen

Mirua et al. beobachteten 1997 an WT B-Zellen, dass durch Leerung des intrazellulären Calciumspeichers (ER) mittels Thapsigargin, einem irreversiblen Inhibitor der SERCAs, ein Calciumeinstrom in die Zelle induziert wird. Dieser Calciumeinstrom wird als kapazitiver (capacitative) oder speicherinduzierter (store-operated) Calciumeinstrom oder auch als Ca<sup>2+</sup>-release-activated-Ca<sup>2+</sup>-current (I<sub>CRAC</sub>) bezeichnet. Calcium gelangt dabei nicht durch Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vom L-Typ in die Zelle, da der Strom resistent gegen D600 (Gallopamil), einem Inhibitor für L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle ist (Miura et al. 1997).

Wie aus den bisher gezeigten Versuchen hervorgeht, führt in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen die Hemmung der Calciumaufnahme in das ER durch CPA zu einer Zunahme der Depolarisation in V<sub>m</sub> (Abb. 4.8). Es sollte nun geklärt werden, ob in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen durch CPA ein kapazitiver Calciumeinstrom induziert wird, über den sich eine verstärkte Depolarisation in V<sub>m</sub> erklären ließe.

Hierzu wurde [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> in isolierten Zellclustern aus Langerhans-Inseln der SUR1<sup>-/-</sup> Mäuse fluoreszenzoptisch gemessen. In G15 oszilliert [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>. Die Hemmung der L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle durch D600 (100 μM) – in Anwesenheit von CPA (10 μM) – führt zu einem sofortigen Absinken in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> auf 60±5 nM. Nach Umschalten auf calciumfreie Badlösung (Ca<sup>2+</sup>-frei) sinkt [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> weiter auf 26±3 nM ab (Abb. 4.12A Pfeil; P≤0,001 n=8).

In Versuchen ohne CPA sinkt [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> nach Zugabe von D600 auf 56±7 nM. Nach Umschalten auf Ca<sup>2+</sup>-frei nimmt [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> lediglich um 8±1 nM weiter ab (Abb. 4.12B Pfeil; P≤0,001 n=8).

Durch die Hemmung der Calciumaufnahme in das ER erhöht sich in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>. Der Anstieg in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> wird nicht durch L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vermittelt (Abb. 4.12). Vermutlich handelt es sich um einen speicherinduzierten Calciumeinstrom, I<sub>CRAC</sub>, der zu einer verstärkten Depolarisation in V<sub>m</sub> führt (Abb. 4.9). Dadurch erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit der L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und es kommt zum Anstieg in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> (Abb. 4.10). Dies könnte die erhöhte Insulinsekretion, die man unter CPA (10 μM) misst, erklären (Abb. 4.11).

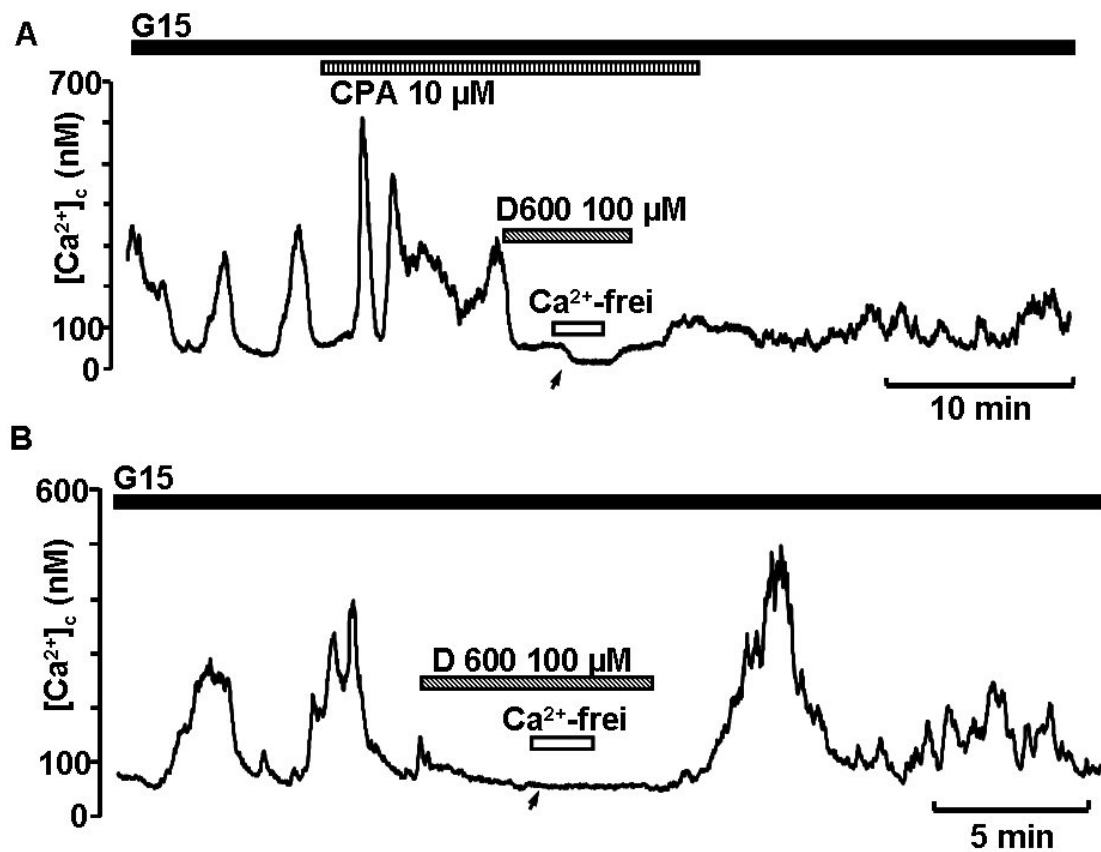


Abb. 4.12 Aktivierung eines speicherinduzierten Calciumeinstroms in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen. Hemmung der L-Typ-Ca<sup>2+</sup> Kanäle durch D600 beendete die Oszillationen und verminderte  $[Ca^{2+}]_c$ . In Zellen die mit 10  $\mu$ M CPA behandelt wurden (A) reduzierte ein Umschalten auf calciumfreie Badlösung,  $[Ca^{2+}]_c$  signifikant höher als in Abwesenheit von CPA (B); (siehe Pfeile; n=8).

## 4.6 Untersuchungen zum „transient drop“ in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen

### 4.6.1 Glucoseinduzierte transiente Abnahme von $[Ca^{2+}]_c$ in WT B-Zellen

In WT B-Zellen ist  $[Ca^{2+}]_c$  in Konzentrationen unter 5 mM Glucose auf basale Werte (ca. 40 nM) erniedrigt. Erhöht man die Glucose auf stimulatorische Konzentration (>10 mM), so kommt es in WT B-Zellen initial zu einem geringen transienten Abfall in  $[Ca^{2+}]_c$  (Abb. 4.13A). Die erhöhte Glucosekonzentration führt zu einer gesteigerten ATP-Produktion, so dass zunächst ATP verbrauchende Prozesse in der Zelle aktiviert werden. Hierzu zählt auch die Aktivierung der SERCAs, die verstärkt Calcium in das ER pumpen und so den transienten Abfall in  $[Ca^{2+}]_c$  in WT B-Zellen erklären (Gylfe 1989, Roe et al. 1994). Inhibiert man die SERCAs, so steigt  $[Ca^{2+}]_c$  nach Erhöhen der Glucose von G0,5 auf G15 sofort an (Abb. 4.13B).

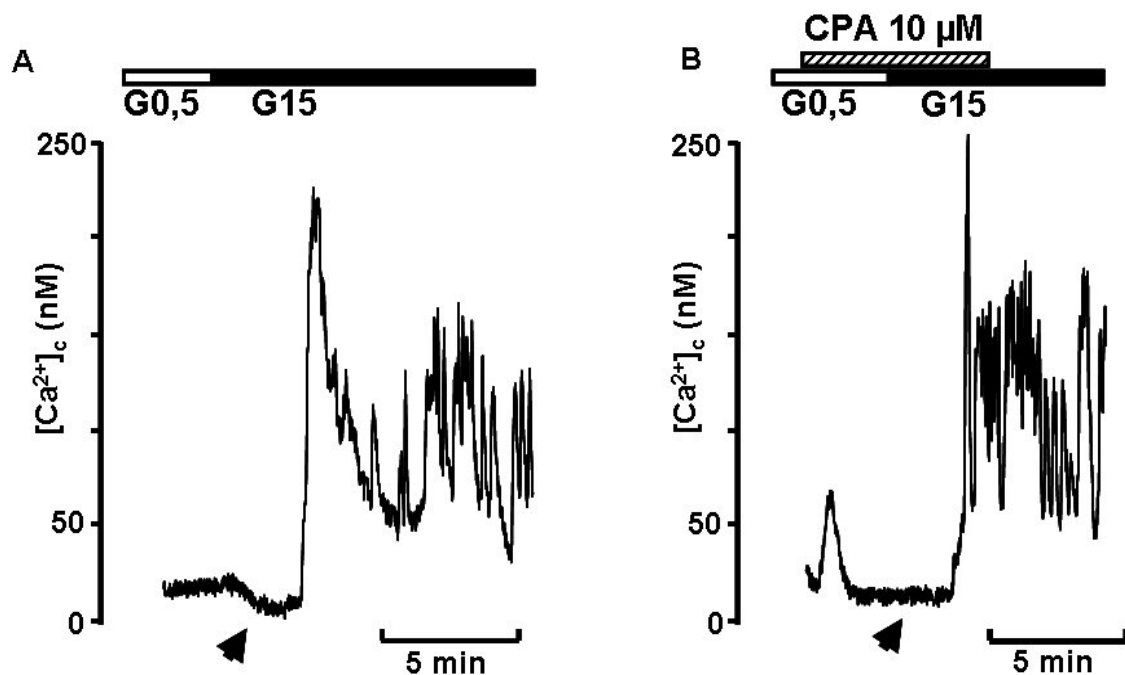


Abb. 4.13 Isolierte Langerhans-Inseln aus WT Mäusen zeigen eine transiente Abnahme in  $[Ca^{2+}]_c$  durch Erhöhen der Glucosekonzentration. Bei durch CPA reversibel gehemmten SERCAs ist diese Abnahme nicht zu beobachten. Siehe Pfeile. (n=3).

#### 4.6.2 Transiente Abnahme der $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als Folge von gesteigertem Glucosemetabolismus in $\text{SUR1}^{-/-}$ B-Zellen

Während WT B-Zellen in niedrigen Glucosekonzentrationen eine basale Calciumkonzentration zeigen, oszilliert  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  in isolierten B-Zell-Clustern von  $\text{SUR1}^{-/-}$  Mäusen oder ist dauerhaft erhöht (Shiota et al. 2002, Düfer et al. 2004).

Interessanterweise kommt es aber in  $\text{SUR1}^{-/-}$  B-Zellen durch Erhöhen der Glucose von Konzentrationen unter 3 mM auf über 10 mM, initial zu einem unerwarteten transienten Abfall in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Shiota et al. 2002, Düfer et al. 2004, Doliba et al. 2004, Li et al. 2004, Nenquin et al. 2004, Abb.4.14). Diese rasche Abnahme in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  bezeichne ich im Weiteren als „transient drop“, da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  von erhöhten Konzentrationen auf sehr niedrige (vergleichsweise der basalen Werte in WT B-Zellen) abfällt. Der transient drop lässt sich unabhängig von dauerhaft erhöhtem  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  oder Oszillationen in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  beobachten (Shiota et al. 2002, Düfer et al. 2004, Doliba et al. 2004, Li et al. 2004, Nenquin et al. 2004). Er dauert  $170 \pm 18$  s ( $n=14$ ). Dabei kommt es nach Umschalten von G0,5 auf G15 transient zu einem Abfall in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  von  $203 \pm 19$  nM auf  $30 \pm 5$  nM ( $P \leq 0,001$ ;  $n=14$ ) und anschließend zu einem Anstieg auf  $293 \pm 33$  nM ( $P \leq 0,001$ ;  $n=14$ ).

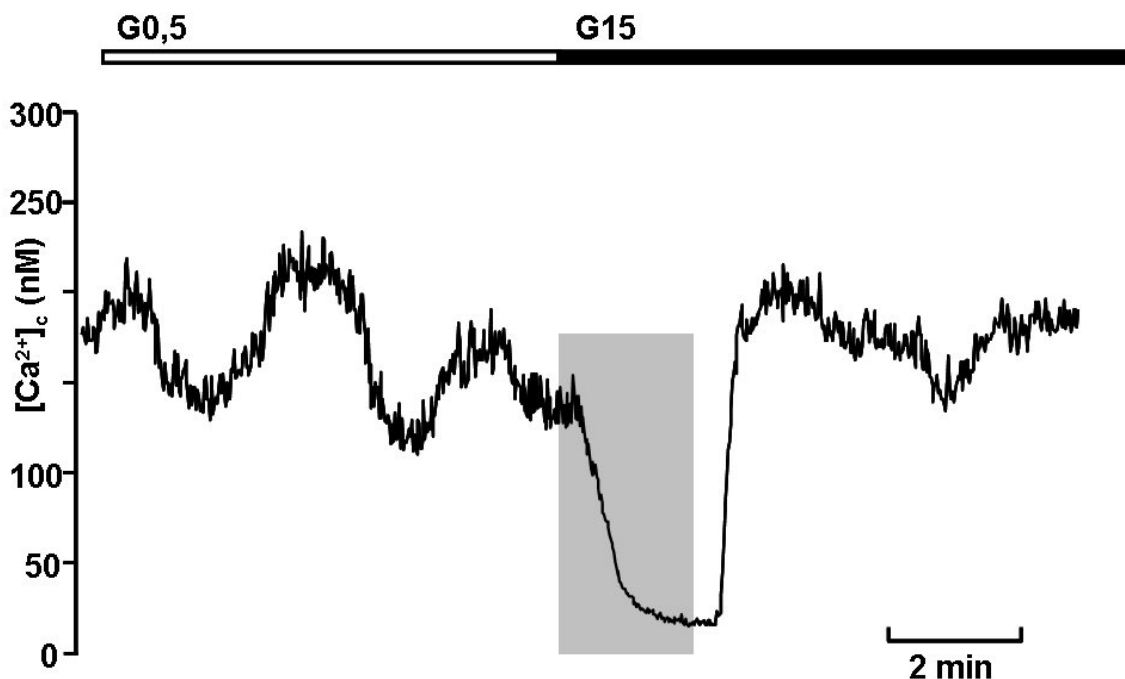


Abb. 4.14 Erhöhen der Glucosekonzentration von 0,5 mM auf 15 mM führt zu einem transienten Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration in  $\text{SUR1}^{-/-}$  B-Zellen (grau unterlegte Fläche).  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  wurde fluoreszenzoptisch gemessen. ( $n=14$ )

Zunächst sollte geklärt werden, ob der transient drop in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen auch durch verstärkte Calciumspeicherung in das ER verursacht wird, wie von Nenquin et al. (2004) vorgeschlagen.

Hierzu wurde in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen unter CPA (10  $\mu$ M) die Glucosekonzentration von 0,5 auf 15 mM erhöht. Interessanterweise tritt der transient drop trotz gehemmter Calciumaufnahme in das ER weiterhin auf (Abb. 4.15).  $[Ca^{2+}]_c$  liegt bei  $236 \pm 52$  nM unter G 0,5 + CPA (10  $\mu$ M) und sinkt auf  $33 \pm 7$  nM nach Umschalten auf G15 + CPA (n=7;  $P \leq 0,05$ ).

Dies bedeutet, dass Calcium in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen während des transient drop nicht in das ER aufgenommen wird.

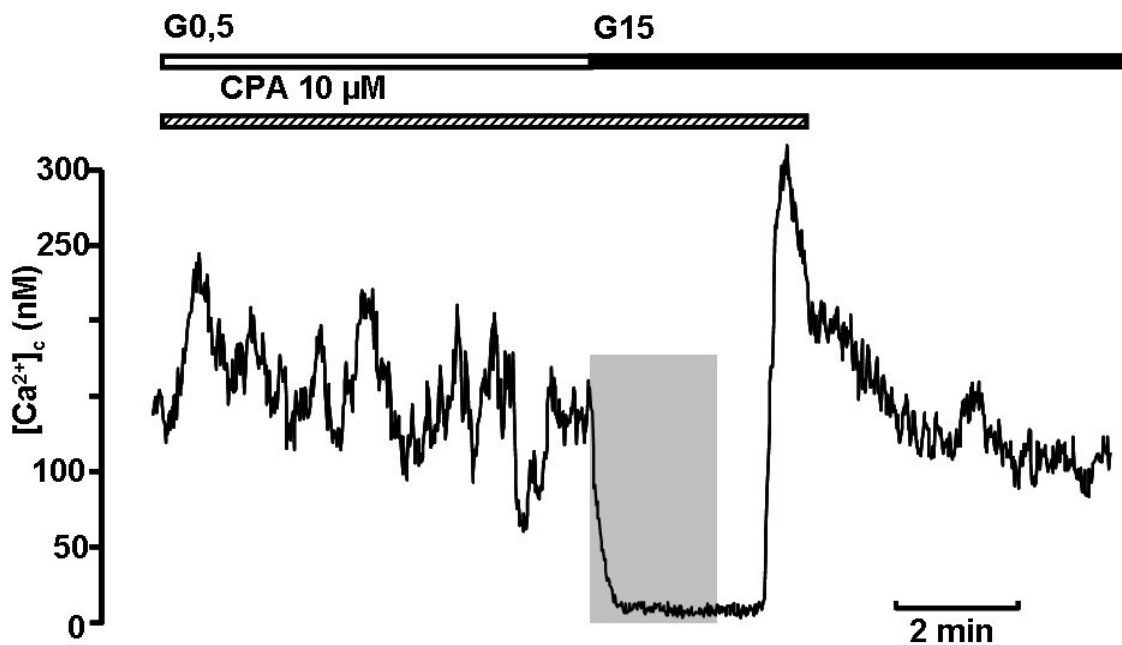


Abb. 4.15 Einfluss von CPA (10 $\mu$ M) auf die transiente Abnahme in  $[Ca^{2+}]_c$  (grau unterlegte Fläche), ausgelöst durch Erhöhen der Glucosekonzentration von 0,5 mM auf 15 mM.  $[Ca^{2+}]_c$  wurde fluoreszenzoptisch gemessen (n=7).

### **4.6.3 Unterbrechung der ATP-Produktion in den Mitochondrien verhindert den transient drop in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen**

Da klar gezeigt werden konnte, dass das ER für den transient drop in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen keine Rolle spielt, sollte nun geklärt werden, ob durch Unterbrechung der ATP-Synthese der transient drop gehemmt werden kann.

Durch die Erhöhung der Glucosekonzentration kommt es zur vermehrten ATP-Synthese. Gleichzeitig hyperpolarisiert das mitochondrielle Membranpotential. Dadurch wird Calcium verstärkt in die Mitochondrien aufgenommen. Es ist daher denkbar, dass in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen die rasche Calciumabnahme bei der Erhöhung der Glucoseaufnahme, durch eine Calciumspeicherung in Mitochondrien verursacht wird.

Die Fähigkeit zur Calciumaufnahme der Mitochondrien konnte bereits vor über 40 Jahren an isolierten Mitochondrien aus der Leber von Ratten gezeigt werden (Vasington und Murphy 1962). Neuere fluoreszenzoptische Untersuchungen mit Farbstoffen, die sich in Mitochondrien anreichern, haben dies bestätigt.

Auch für insulinsezernierende B-Zelllinien gibt es Untersuchungen zur Calciumspeicherfähigkeit der Mitochondrien (Rutter et al. 1993). Mitochondrien nehmen Calcium aus dem Cytosol über einen Rutheniumrot-sensitiven Uniporter auf, der sich in der inneren Mitochondrienmembran befindet. Es handelt sich um eine passive, elektrogene Aufnahme, die durch das hohe negative Potential (-180 mV) über der inneren Mitochondrienmembran möglich wird. Das Potential wird durch den Protonengradient entlang der Elektronentransportkette aufgebaut.

Die Calciumaufnahme in die Mitochondrien kann demnach sowohl durch Hemmung des Rutheniumrot-sensitiven Uniporters, als auch durch Entkopplung des Protonengradienten mit Protonophoren, verhindert werden.

Eine Möglichkeit den Protonengradienten zu entkoppeln besteht darin, die innere Mitochondrienmembran für Protonen durchlässig zu machen, so dass diese frei hindurch diffundieren können. Das erreicht man dadurch, dass lipophile schwache Säuren wie 2,4-Dinitrophenol (DNP) oder FCCP (Carbonylcyanid-p-trifluormethoxyphenyl-hydrazon) Protonen auf der einen Seite der Membran aufnehmen. Diese können aufgrund ihrer Lipophilie die Membran passieren und das Proton auf der anderen Seite der Membran wieder abgeben. Dadurch wird die Elektronentransportkette entkoppelt und somit die ATP-Synthese unterbunden.

Hierdurch wird die Calciumaufnahme in die Mitochondrien gehemmt.

Die Hemmung des Rutheniumrot-sensitiven Uniporters in B-Zellen ist äußerst schwierig. Daher wurde für die Hemmung der ATP-Synthese FCCP ausgewählt, um die Calciumaufnahme in die Mitochondrien zu verhindern.

Anschließend wurde in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen untersucht ob durch FCCP der transient drop gehemmt werden kann. Hierzu verwendete man FCCP in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$ . Durch die Zugabe von FCCP in G0,5 kommt es zu einem biphasischen Verlauf in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ : Zunächst steigt  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  von  $216 \pm 17$  nM auf  $478 \pm 36$  nM an und sinkt dann auf ein Plateau von  $321 \pm 29$  nM ( $P \leq 0,01$ ;  $n=9$ ) ab. Erhöht man die Glucosekonzentration auf 15 mM Glucose bei gleichzeitiger Gabe von FCCP (0,5  $\mu\text{M}$ ), kommt es lediglich zu einem geringen Absinken in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  auf  $206 \pm 21$  nM ( $P \leq 0,01$ ;  $n=9$ ). Das bedeutet, dass das Calcium erhöht bleibt. Nach Auswaschen von FCCP fällt  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  sofort transient auf  $36 \pm 9$  nM ab ( $P \leq 0,001$ ;  $n=9$ ; Abb. 4.16).

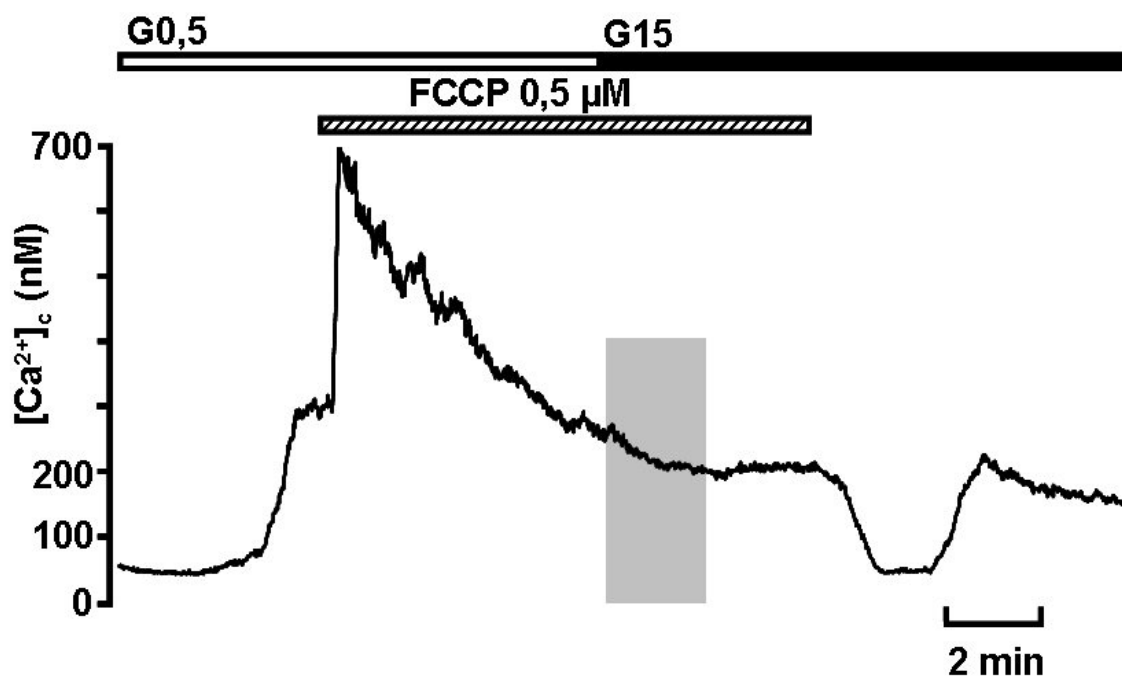


Abb. 4.16 Dargestellt ist eine typische fluoreszenzoptische Messung von  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  einer SUR1<sup>-/-</sup> B-Zelle. Das Erhöhen der Glucosekonzentration von 0,5 auf 15 mM und gleichzeitiger Gabe von FCCP (0,5) verhindert den transient drop. Grau unterlegt ist die Zeitspanne, in der üblicherweise der transient drop beginnt ( $n=9$ ).

Um den Einfluss des ER als Calciumspeicher zu unterbinden, wurden die Versuche in einer neuen Serie in Anwesenheit von CPA (10  $\mu\text{M}$ ) wiederholt. Auch hier kommt es zu einem biphasischen Verlauf in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .

Nach Zugabe von FCCP (0,5  $\mu\text{M}$ ) in G0,5 und in Anwesenheit von CPA (10  $\mu\text{M}$ ) steigt  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  von  $203 \pm 15$  nM auf  $362 \pm 15$  nM ( $P \leq 0,05$ ;  $n=6$ ) an und sinkt dann rasch auf ein Plateau von  $270 \pm 28$  nM ( $P \leq 0,05$ ;  $n=6$ ) ab. Erhöht man nun die Glukosekonzentration auf 15 mM unter Zugabe von CPA (10  $\mu\text{M}$ ) und FCCP (0,5  $\mu\text{M}$ ), sinkt  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , trotz gehemmter SERCAs, nur gering auf  $209 \pm 19$  nM ab ( $P \leq 0,05$ ;  $n=6$ ). Durch Auswaschen von FCCP kommt es sofort zur Abnahme in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Dabei sinkt  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  transient auf  $33 \pm 4$  nM ( $P \leq 0,001$ ;  $n=6$ ; Abb. 4.17) ab.

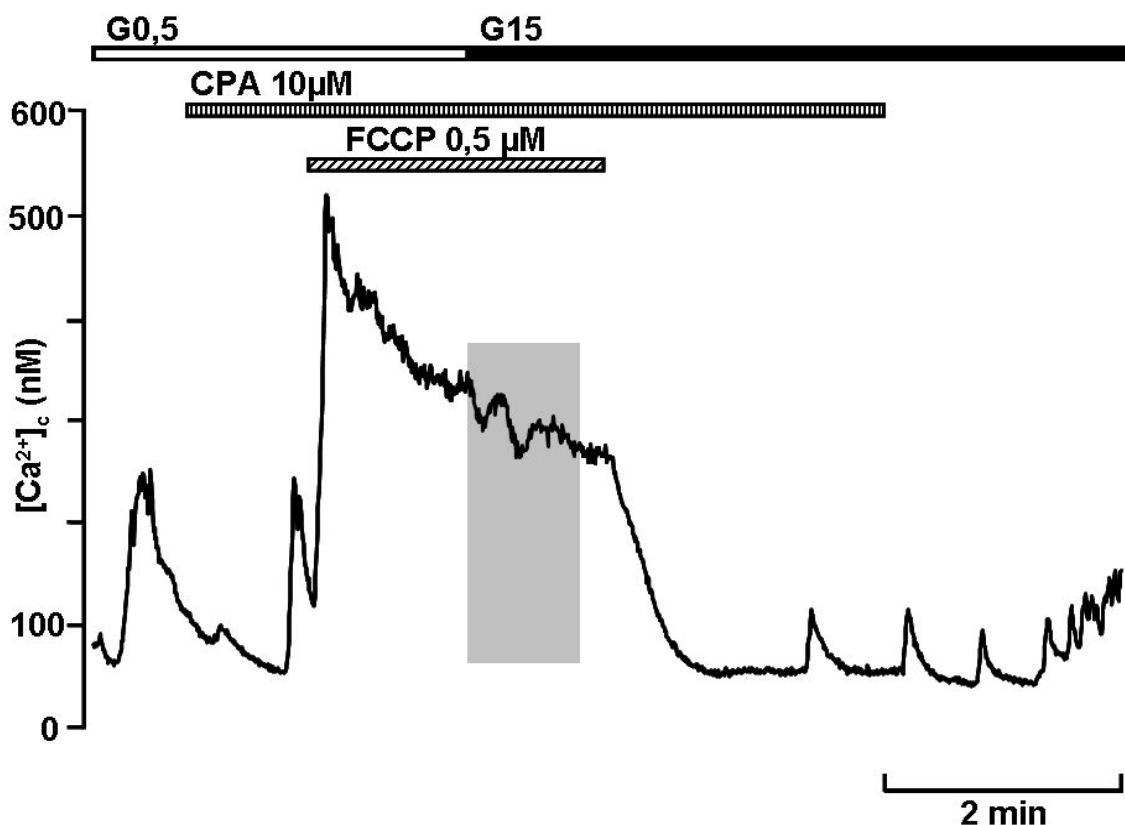


Abb. 4.17 Erhöhen der Glukosekonzentration von 0,5 auf 15 mM bei gleichzeitig gehemmter Calciumaufnahme in das ER (CPA 10  $\mu\text{M}$ ) und in die Mitochondrien (FCCP 0,5  $\mu\text{M}$ ) verhindert den transienten Abfall in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (grau unterlegte Fläche). Die Messungen wurden fluoreszenzoptisch durchgeführt ( $n=6$ ).

Neben FCCP kann die ATP-Produktion in den Mitochondrien durch Natriumazid unterbunden werden. Natriumazid ist ein effektiver und spezifischer Hemmstoff für die Cytochrome-c Oxidase, dem IV. und letzten Proteinkomplex der Atmungskette.

Die Versuche mit FCCP sprechen dafür, dass der transient drop in der Tat ATP-abhängig ist. Um diese These zu untermauern wurde eine weitere Versuchsserie mit Natriumazid in der Anwesenheit von CPA durchgeführt.

Es kam dabei analog zu den Versuchen mit FCCP zu einem biphasischen Verlauf der Calciumkonzentration. Nach Zugabe von CPA (10 $\mu$ M) in G0,5 war Calcium erhöht oder oszillierte weiter. Fügt man nun Natriumazid (5 mM) hinzu, kommt es zu einem Peak in  $[Ca^{2+}]_c$ . Dabei steigt die Konzentration rasch von 204 $\pm$ 23 nM (G0,5 + CPA) auf 428 $\pm$ 47 nM an (G0,5 + CPA + Azid;  $P\leq 0,05$ ; n=4), und fällt dann auf 198 $\pm$ 23 nM ab ( $P\leq 0,05$ ; n=4). Durch Zugabe von G15 kommt es nur zu einem marginalen Abfall auf 162 $\pm$ 10 nM (n.s.; n=4). Nach dem Auswaschen von Azid fällt  $[Ca^{2+}]_c$  allerdings sofort und transient auf 38 $\pm$ 7 nM ab ( $P\leq 0,0001$ ; n=4; Abb. 4.18).

Damit konnte klar gezeigt werden, dass durch Hemmung der ATP-Produktion der transient drop unterbunden werden kann. Die Calciumaufnahme in die Mitochondrien ist vom Membranpotential der Mitochondrien abhängig. Durch Zugabe von FCCP bzw. Natriumazid kommt es zur Depolarisation der Mitochondrien, so dass eine Calciumaufnahme in dieses Kompartiment verhindert ist.

Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass es sich beim transient drop um eine vorübergehende schnelle Calciumaufnahme in die Mitochondrien handeln könnte, da der transient drop immer dann auftritt, wenn es in den Mitochondrien zur gesteigerten ATP-Produktion kommt.

Die ATP-Synthese geht einher mit einer Hyperpolarisation in  $\Delta\Psi$  und dadurch wird Calcium in die Mitochondrien aufgenommen, so dass die Voraussetzung für eine Calciumaufnahme in die Mitochondrien aufgrund gesteigerten Glucosemetabolismus gegeben wäre.

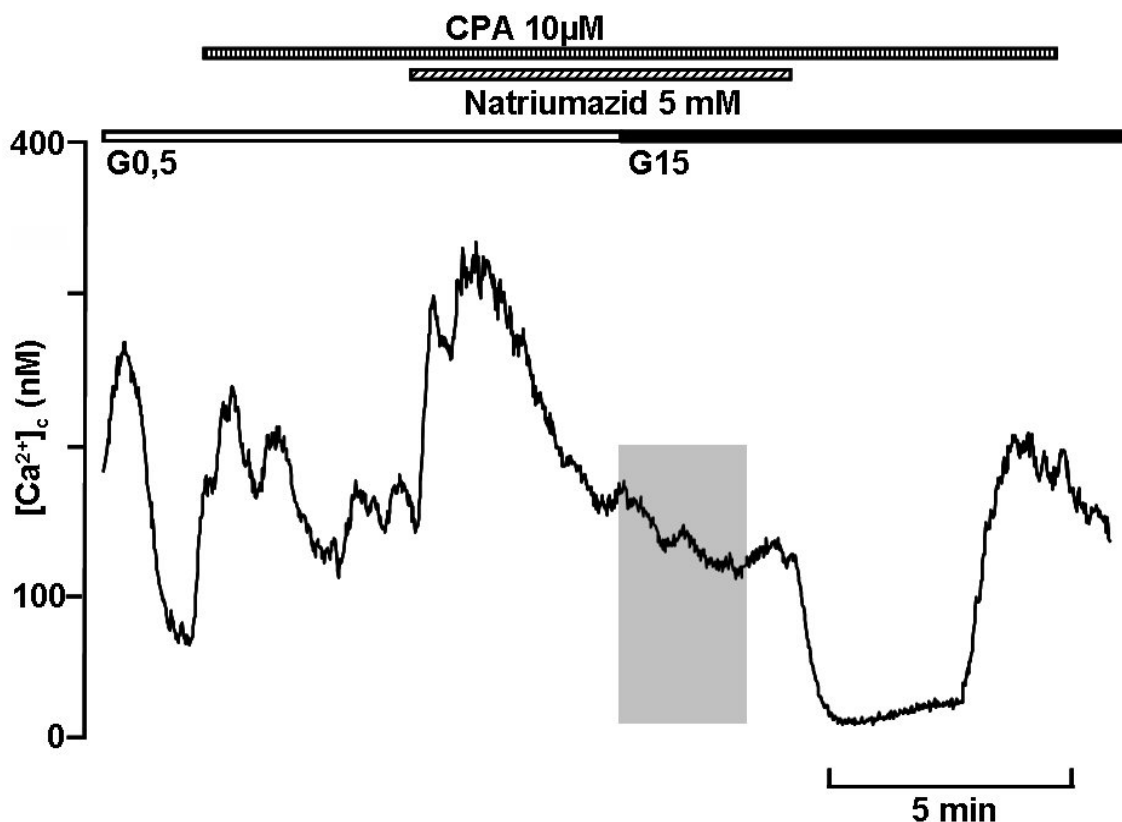


Abb. 4.18 Erhöhen der Glucosekonzentration von 0,5 auf 15 mM, bei gleichzeitig gehemmter Calciumaufnahme in das ER (CPA 10 $\mu$ M) und gehemmter ATP-Synthese (Natriumazid 5 mM), verhindert den transienten Abfall in  $[Ca^{2+}]_c$  (grau unterlegte Fläche). Die Messungen wurden fluoreszenzoptisch durchgeführt (n=4).

#### 4.6.4 Transiente Hyperpolarisation in $V_m$ durch gesteigerten Glucosemetabolismus

In Kap. 4.3 konnte eine Kopplung von  $V_m$  und  $[Ca^{2+}]_c$  in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen gezeigt werden. Daher ist es denkbar, dass eine transiente Membranhyperpolarisation und dadurch ein transientes Schließen der L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle die Ursache für die rasche Abnahme in  $[Ca^{2+}]_c$  (transient drop) ist.

Um eine mögliche Beteiligung des Membranpotentials beim transient drop zu klären wurden Mikroelektrodenversuche durchgeführt. Interessanterweise führt das Erhöhen der Glucosekonzentration von 0,5 auf 15 mM zu einer transienten Hyperpolarisation in  $V_m$  um  $8 \pm 1$  mV (Abb. 4.19; n=6). Sieg et al. (2004) berichten ebenfalls von einer transienten Hyperpolarisation in  $V_m$  in isolierten SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen nach Erhöhen der Glucosekonzentration, gemessen in der Ganzzelleableitung mittels Patch-clamp Technik.

In den Mikroelektrodenexperimenten dauert die transiente Hyperpolarisation  $165 \pm 5$  s ( $n=6$ ). Dieser Wert korreliert zeitlich gut mit der Dauer des transient drop in  $[Ca^{2+}]_c$ :  $187 \pm 26$  s ( $n=14$ ).

Es könnte sich demnach beim transient drop in  $[Ca^{2+}]_c$  nicht ausschließlich um eine Calciumaufnahme in ein intrazelluläres Kompartiment sondern auch um einen verminderten Calciumeinstrom über die Plasmamembran handeln.

Nun ergab sich die Frage, welche Kanäle an der glucoseinduzierten Hyperpolarisation beteiligt sind. Da es in  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen keine  $K_{ATP}$ -Kanäle mehr gibt, kommen  $K_v$ - und  $K(Ca^{2+})$ -Kanäle als mögliche Kandidaten in Betracht.

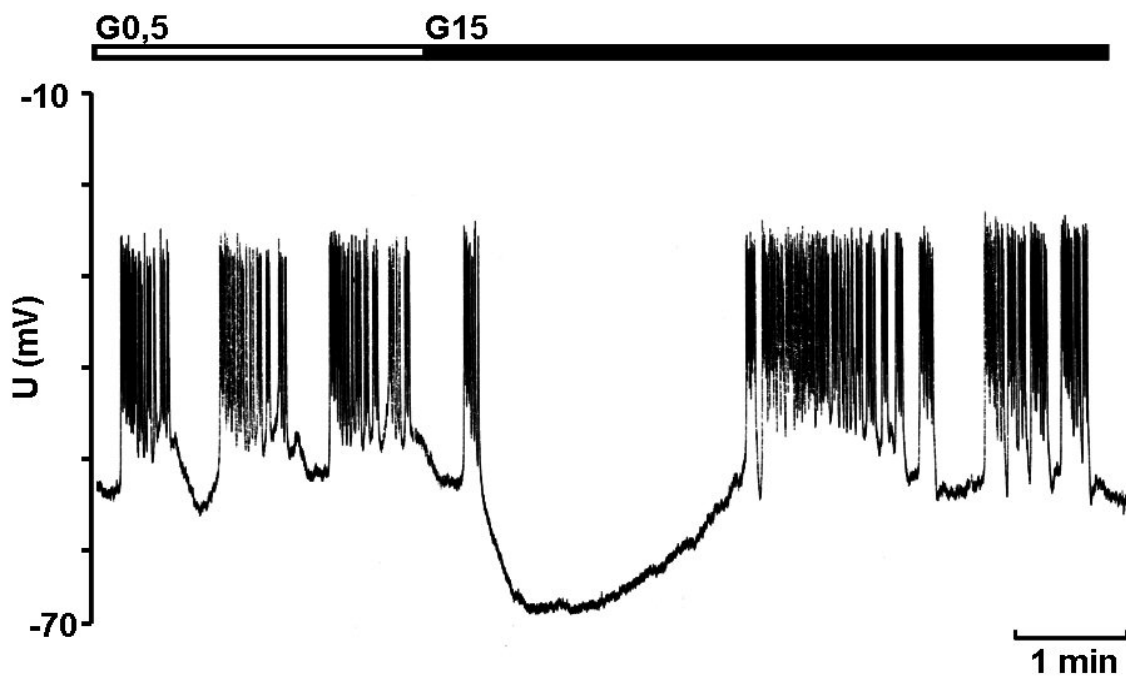


Abb 4.19  $V_m$  einer  $SUR1^{-/-}$  B-Zelle gemessen mit der Mikroelektrode in einer intakten Langerhans-Insel. Durch Erhöhen der Glucosekonzentration von 0,5 auf 15 mM, kommt es zur transienten Hyperpolarisation des Membranpotentials ( $n=6$ ).

#### 4.6.5 Untersuchung zur Beteiligung der $K_v$ -Kanäle beim transient drop

Pankreatische B-Zellen haben neben  $K_{ATP}$ -Kanälen noch andere Kaliumkanäle in ihrer Membran (siehe Kap 1.6). Möglicherweise sind diese Kanäle an der Repolarisation des Membranpotentials der B-Zelle bei fehlenden  $K_{ATP}$ -Kanälen von besonderer Bedeutung. In WT B-Zellen spielen  $K_v$ - bzw.  $K(Ca^{2+})$ -Kanäle lediglich bei der Form der Calcium-

Aktionspotentiale eine Rolle (Smith et al. 1990b, Göpel et al. 1999, Su et al. 2001, MacDonald und Wheeler 2003). Tetraethylammoniumchlorid ( $\text{TEA}^+$ ) hemmt konzentrationsabhängig Kaliumkanäle. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass  $\text{TEA}^+$   $\text{K}_v$ -Kanäle in insulinsezernierenden Zelllinien und B-Zellen bereits in niedrigen Konzentrationen ( $\text{K}_m$ : 1-2 mM) hemmt (Findlay et al. 1985, Fatherazi und Cook 1989, Tabcharani und Misler 1989, Bokvist et al. 1990a),  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle jedoch erst bei höheren Konzentrationen von  $\text{TEA}^+$  ( $\text{K}_m$ : 20 mM) gehemmt werden (Fatherazi und Cook 1989, Bokvist et al. 1990b, Henquin 1990).

Um eine Beteiligung der  $\text{K}_v$ - bzw.  $\text{K}(\text{Ca}^{2+})$ -Kanäle bei der transienten Hyperpolarisation bzw. dem transient drop in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  nach Glucosestimulus zu untersuchen, wurden 20 mM  $\text{TEA}^+$  eingesetzt. Hierdurch werden alle  $\text{TEA}^+$ -sensitiven Kaliumkanäle in  $\text{SUR1}^-$  B-Zellen erfasst.

Zunächst wurde der Effekt von  $\text{TEA}^+$  (20 mM) auf die durch Glucosestimulus ausgelöste Hyperpolarisation in  $V_m$  untersucht. Hierzu wurde das Membranpotential mit der Mikroelektrode gemessen und die Glucosekonzentration unter Zusatz von  $\text{TEA}^+$  (20 mM) von G0,5 auf G15 erhöht. Durch  $\text{TEA}^+$  (20 mM) verändern sich die klassischen Oszillationen in  $V_m$ . Das Plateaupotential lässt sich nicht mehr vom Interburstpotential unterscheiden. Im Vergleich zu Experimenten ohne  $\text{TEA}^+$  werden hier die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktionspotentiale während der Burst-Phase von einem negativeren Potential ausgelöst (Abb. 4.20 A).

Erhöht man die Glucosekonzentration unter Zusatz von  $\text{TEA}^+$  (20 mM) von G0,5 auf G15, kommt es transient zur Beendigung der Aktionspotentiale sowie zu einer Hyperpolarisation um  $6 \pm 2$  mV (Abb. 4.20 A). Experimente ohne  $\text{TEA}^+$  zeigen eine Hyperpolarisation um  $8 \pm 1$  mV (n.s.; n=3 bzw. 6) durch Erhöhen der Glucosekonzentration. Die Dauer der Hyperpolarisation beträgt  $122 \pm 46$  s mit  $\text{TEA}^+$  und  $165 \pm 12$  s in Experimenten ohne  $\text{TEA}^+$  (n.s.; n=3 bzw. 6).

Die Experimente zeigen, dass die  $\text{TEA}^+$ -sensitiven Kaliumkanäle nicht an der transienten Hyperpolarisation (Abb. 4.20 A) beteiligt sind. Auch eine Beteiligung an der transienten Calciumabnahme (Abb. 4.20 B) kann ausgeschlossen werden. Unter G0,5 und  $\text{TEA}^+$  (20 mM) oszillierte  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Abb. 4.18B). Durch Erhöhen der Glucosekonzentration auf G15 fiel  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  transient von  $327 \pm 43$  nM auf  $25 \pm 7$  nM ( $P \leq 0,001$ ; n=7).

In Kontrollexperimenten ohne  $\text{TEA}^+$  kam es durch den Glucosestimulus zu einer Abnahme in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  von  $209 \pm 16$  nM auf  $32 \pm 6$  nM (nicht gezeigt;  $P \leq 0,001$ ; n=7).

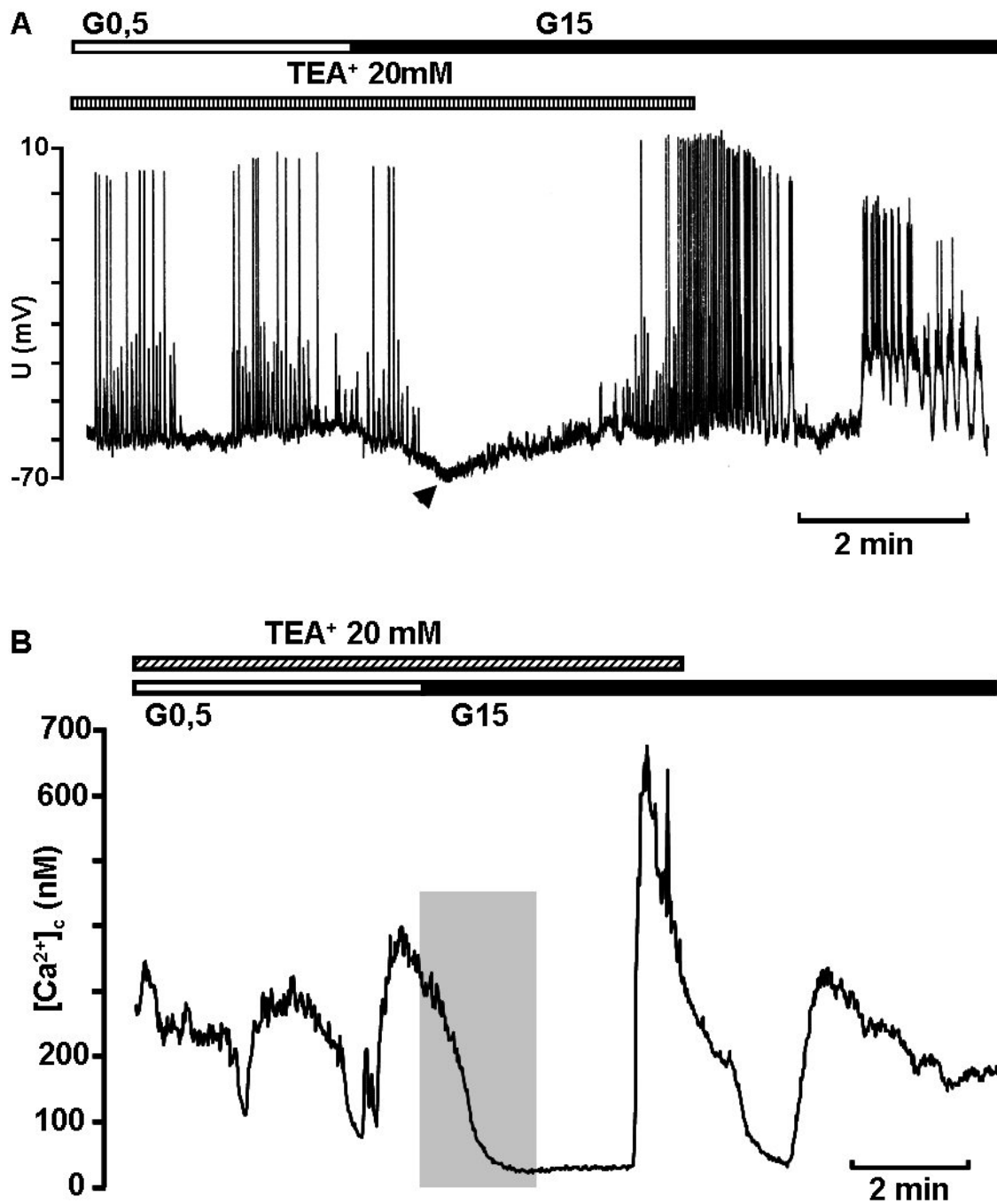


Abb. 4.20 Einfluss von TEA<sup>+</sup> (20mM) auf die durch Glucosestimulus ausgelöste transiente Hyperpolarisation in  $V_m$  (A) und die transiente Abnahme in  $[Ca^{2+}]_c$  (B) in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen.  $V_m$  wurde mit der Mikroelektrode und  $[Ca^{2+}]_c$  fluoreszenzoptisch bestimmt. (A: n=3; B: n=7)

#### 4.6.6 Hemmung der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase verhindert die transiente Hyperpolarisation in $\text{SUR1}^{-/-}$ B-Zellen

Erhöht man die Glucosekonzentration von 0,5 auf 15 mM, wird Glucose in die B-Zelle aufgenommen und über die Glycolyse verstoffwechselt. Dies führt zu einer vermehrten Bildung von ATP in den Mitochondrien, d.h. das Verhältnis von ATP/ADP wird zugunsten des ATP erhöht.

Die transiente Hyperpolarisation in den B-Zellen der  $\text{SUR1}^{-/-}$  Mäuse und der damit verbundene transient drop in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  kann also entweder durch Glucose selbst oder aber durch die Metabolisierung der Glucose ausgelöst werden.

Dass Glucose selbst in der Lage ist eine Hyperpolarisation der Zellmembran auszulösen, ist bisher nicht beschrieben worden, und auch nicht sehr wahrscheinlich, da es keinen bekannten hyperpolarisierenden Strom an Zellen gibt, der direkt durch Glucose aktiviert werden kann.

Für ATP gibt es mehrere Angriffspunkte. Zunächst die Mitochondrien selbst. Durch die verstärkte ATP-Synthese kann Calcium vermehrt in die Mitochondrien aufgenommen werden. Dieser Vorgang lässt sich durch Entkoppeln der Mitochondrien verhindern (siehe Kap. 4.6.3). Dies deutet daraufhin, dass der transient drop durch verstärkte ATP-Synthese und damit nur indirekt durch Glucose ausgelöst wird.

Ob es sich beim transient drop um eine verstärkte Calciumaufnahme in die Mitochondrien handelt, lässt sich allein aus der Tatsache, dass unter FCCP und Natriumazid der transient drop verhindert ist, nicht entscheiden, da mit FCCP bzw. Natriumazid auch alle ATP-abhängigen Prozesse der B-Zelle, z.B. ATPasen, beeinflusst werden.

Eine Hyperpolarisation in  $V_m$  lässt sich durch eine mitochondrielle Calciumaufnahme ebenfalls nicht erklären. Da die transiente Hyperpolarisation und der transient drop in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  zeitlich korreliert sind (siehe Kap. 4.6.4), liegt die Vermutung nahe, dass durch die erhöhte ATP-Produktion eine transiente Hyperpolarisation ausgelöst wird, die zum Schließen der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle führt und somit den transient drop in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  auslöst. Dies würde bedeuten, dass eine verstärkte ATP-Synthese in  $\text{SUR1}^{-/-}$  B-Zellen zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran führt, auch wenn  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle in der Plasmamembran fehlen.

Aber durch welchen Mechanismus kommt es bei gesteigerter ATP-Produktion zur Hyperpolarisation in  $V_m$ ?

Ein wichtiger ATP-abhängiger Prozess der Plasmamembran ist der Austausch von 3 Natriumionen gegen 2 Kaliumionen über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Damit wird gewährleistet, dass die Ionenkonzentrationen für Natrium und Kalium intra- und extrazellulär stabil bleiben. Aktiviert man die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, so wird vermehrt positive Ladung aus der Zelle transportiert, es resultiert ein hyperpolarisierender Strom. Wird die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase dagegen gehemmt, so depolarisiert die Zelle.

Die Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durch Insulin wurde an verschiedenen Zelltypen gezeigt und ist am häufigsten in Skelettmuskelzellen untersucht worden (als review: Therien und Blostein 2000). Herzglykoside wie z.B. Ouabain sind direkte Antagonisten der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Tatsächlich führt auch in WT B-Zellen die Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durch Ouabain zu einer Depolarisation in  $V_m$  (Henquin und Meissner 1982), zu einer Erhöhung in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Siegel et al. 1980, Nilsson et al. 1988, Grapengiesser et al. 1993, Owada et al. 1999) und damit zu einer verstärkten Insulinsekretion (Triner et al. 1968, Hales und Milner 1968, Lambert et al. 1974, Siegel et al. 1980, Bozem und Henquin 1988, Kajikawa et al. 2002).

Induziert also die Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, möglicherweise über Insulin, in den  $\text{SUR1}^{-/-}$  B-Zellen einen hyperpolarisierenden Strom, der ausreichend ist um bei geringem Membranwiderstand (durch fehlende  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle) die Plasmamembran so zu hyperpolarisieren, dass es transient zu einem Schließen der L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle kommt? Ouabain (1 mM) in Anwesenheit von 0,5 mM Glucose führt in  $\text{SUR1}^{-/-}$  B-Zellen zu einer Depolarisation in  $V_m$  mit kontinuierlicher Spikeaktivität (Abb. 4.21). Dabei steigt die FOPP von  $57 \pm 3\%$  in G0,5 auf 100% nach Zugabe von Ouabain (1 mM) an ( $P \leq 0,001$ ;  $n=3$ ). Erhöht man die Glucosekonzentration unter gleichzeitiger Gabe von Ouabain (1mM) auf 15 mM, bleibt  $V_m$  dauerdepolarisiert mit kontinuierlicher Spikeaktivität (Abb. 4.21). Nach Auswaschen von Ouabain kommt es zu einer sofortigen Hyperpolarisation um  $31 \pm 2$  mV ( $n=3$ ) und nach  $487 \pm 40$  s ( $n=3$ ) treten wieder slow-waves auf (Abb. 4.21).

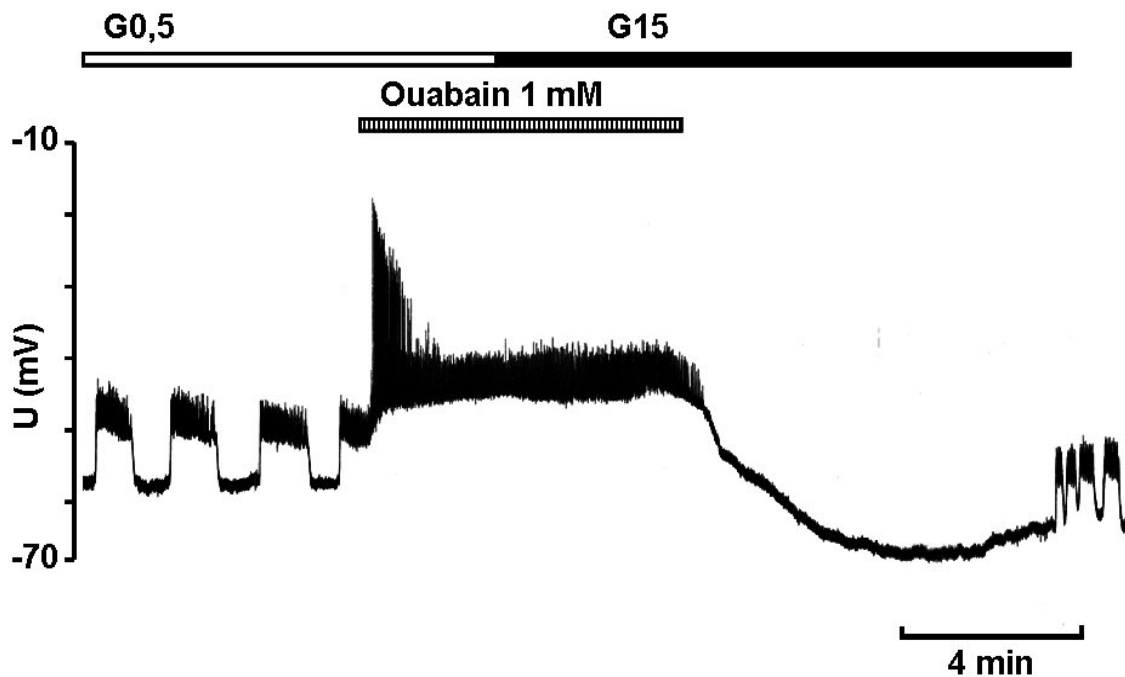


Abb. 4.21 Effekt von Ouabain (1 mM) auf die beim Erhöhen der Glucosekonzentration zu beobachtende transiente Hyperpolarisation in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen, gemessen mit der Mikroelektrode (n=3).

Eine Aktivierung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase könnte demnach die transiente Hyperpolarisation in V<sub>m</sub>, induziert durch Glucosestimulus, auslösen, zum Schließen der L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle führen und somit den transient drop in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> ermöglichen.

Ob beim transient drop zusätzlich auch eine mitochondrielle Calciumaufnahme beteiligt ist, lässt sich aus den bisherigen Versuchen nicht klar zeigen. Eine mitochondrielle Calciumaufnahme als alleinige Ursache für den transient drop scheint aber nach diesen Ergebnissen ausgeschlossen. Interessant ist die Beobachtung, dass das ER, das ja bei WT B-Zellen als Hauptcalciumspeicher gilt, für den transient drop nicht von Bedeutung zu sein scheint.

Nun stellte sich natürlich die Frage ob es auch in WT B-Zellen, durch Hemmung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle, zu einem transienten Abfall in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> nach Erhöhen der Glucosekonzentration von 0,5 auf 15 mM kommt.

In der Tat zeigt Abb. 4.22, dass sich auch in WT B-Zellen durch Hemmung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle mit einem Sulfonylharnstoff (Tolbutamid 1 mM) der transient drop imitieren lässt. Dabei steigt [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> unter G0,5 von 50±11 nM nach Zugabe von Tolbutamid (1 mM) auf 319±40 nM (P≤0,05; n=3) und fällt nach Erhöhen der Glucosekonzentration auf 15 mM sofort transient auf 39±6 nM ab (Abb. 4.22A; P≤0,05; n=3).

Bei durch CPA gehemmter Calciumaufnahme ins ER ergeben sich analoge Ergebnisse. Hier steigt  $[Ca^{2+}]_c$  in G0,5 von  $49 \pm 11$  nM durch Zugabe von Tolbutamid (1 mM) auf  $329 \pm 26$  nM ( $P \leq 0,01$ ;  $n=4$ ). Nach Zugabe von CPA (10  $\mu$ M) kommt es zu einem leichten Abfall in  $[Ca^{2+}]_c$  auf  $278 \pm 28$  nM ( $P \leq 0,05$ ;  $n=4$ ). Erhöhen der Glucosekonzentration auf 15 mM führt ebenfalls zu einem sofortigen und transienten Absinken in  $[Ca^{2+}]_c$  auf  $51 \pm 10$  nM (Abb. 4.22B;  $P \leq 0,01$ ;  $n=4$ ).

Durch die Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanäle oder den Knockout der SUR1-UE kommt es durch Erhöhen der Glucosekonzentration transient zu einer Abnahme in  $[Ca^{2+}]_c$ . Das ER spielt hierbei höchstens eine untergeordnete Rolle. Vielmehr ist eine transiente Hyperpolarisation, möglicherweise durch Aktivierung der  $Na^+/K^+$ -ATPase, als Ursache der beobachteten Calciumabnahme anzusehen.



## 4.7 Hemmung des $K_{ATP}$ -Kanals bzw. Knockout der SUR1-UE führt zu veränderter Calciumspeicherung in B-Zellen

### 4.7.1 Calciumspeicherung in WT B-Zellen

Die Bedeutung der Mitochondrien bei den glucoseinduzierten Oszillationen der B-Zelle ist unumstritten (Krippeit-Drews et al. 2000, Kindmark et al. 2001).

Durch Calciumaufnahme in die Mitochondrien kommt es zur Depolarisation von  $\Delta\Psi$  und damit zum Absinken des ATP/ADP-Quotienten. Infolgedessen öffnen die  $K_{ATP}$ -Kanäle, wodurch  $V_m$  repolarisiert, die L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle nach Unterschreiten des Schwellenpotentials schließen und  $[Ca^{2+}]_c$  absinkt. Eine Abnahme in  $[Ca^{2+}]_c$  geht einher mit einer Abnahme in  $[Ca^{2+}]_m$ . Hierdurch kommt es zur Repolarisation von  $\Delta\Psi$ . Der ATP/ADP-Quotient steigt durch die nun wieder vermehrte ATP-Synthese an und erneut schließen die  $K_{ATP}$ -Kanäle und  $[Ca^{2+}]_c$  steigt wieder an.

Krippeit-Drews et al. (2000) konnten zeigen, dass durch Depolarisation der Mitochondrien die Calciumhomöostase der B-Zelle beeinflusst werden kann. Unterbricht man die ATP-Produktion durch Natriumazid oder entkoppelt man die Mitochondrien mit FCCP, so kommt es zur Freisetzung von Calcium. Diese Freisetzung lässt sich durch Vorinkubation mit Thapsigargin, einem irreversiblen Inhibitor der SERCAs vollständig unterbinden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Calcium in WT B-Zellen in erster Linie im ER gespeichert wird und durch Hemmung der ATP-Synthese freigesetzt wird.

Abbildung 4.23A macht deutlich, dass auch durch FCCP (0,5  $\mu$ M) in WT B-Zellen eine Calciumfreisetzung aus dem ER induziert werden kann, wie es von Krippeit-Drews et al. (2000) in Versuchen mit Natriumazid bereits beschrieben wurde.

Die Zugabe von FCCP in G15 stoppt sofort die Calciumoszillationen. Es kommt zunächst zu einem Anstieg in  $[Ca^{2+}]_c$  von  $355\pm 39$  nM auf  $606\pm 74$  nM ( $P\leq 0,001$ ;  $n=6$ ) nach Zugabe von FCCP (0,5  $\mu$ M), mit nachfolgendem Absinken auf ein Plateau von  $118\pm 16$  nM ( $P\leq 0,01$ ;  $n=6$ ; Abb. 4.23A).

Inhibiert man die SERCAs mit CPA (10  $\mu$ M), so kommt es nach Zugabe von FCCP (0,5  $\mu$ M) zu einem direkten Absinken in  $[Ca^{2+}]_c$  von  $330\pm 50$  nM auf  $129\pm 21$  nM ( $P\leq 0,01$ ;  $n=7$ ; Abb. 4.23B; siehe auch Krippeit-Drews et al. 2000).

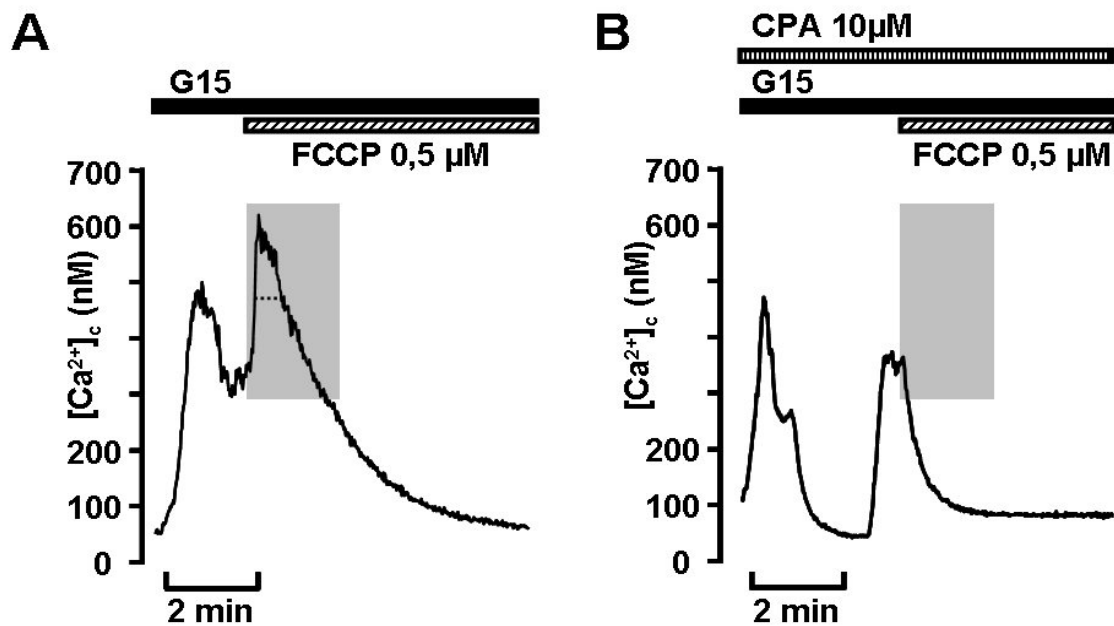


Abb. 4.23 Dargestellt ist der Einfluss von FCCP ( $0,5 \mu\text{M}$ ) auf  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  in WT B-Zellen, jeweils ohne (A;  $n=6$ ) und mit (B;  $n=7$ ) Hemmung der Calciumaufnahme in das ER durch CPA ( $10 \mu\text{M}$ ). Die gestrichelte Linie in A zeigt die Peakhalbwertsbreite der Calcium-Freisetzung aus dem ER an.

#### 4.7.2 Calciumspeicherung in $\text{SUR1}^{-/-}$ B-Zellen

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum transient drop in  $\text{SUR1}^{-/-}$  B-Zellen (Kap. 4.6) führten zu der Vermutung, dass in  $\text{SUR1}^{-/-}$  B-Zellen im Gegensatz zu WT B-Zellen das ER nicht alleine an der Calciumspeicherung und damit an der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase in den B-Zellen beteiligt ist. Abb. 4.16, 4.17 bzw. 4.23B zeigen, dass FCCP ( $0,5 \mu\text{M}$ ) bzw. Natriumazid ( $5 \text{ mM}$ ) selbst bei gehemmter Calciumspeicherung in das ER (durch CPA  $10 \mu\text{M}$ ), in  $\text{SUR1}^{-/-}$  B-Zellen zu einem Anstieg in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  führt.

In  $\text{SUR1}^{-/-}$  B-Zellen kommt es analog zum WT durch FCCP ( $0,5 \mu\text{M}$ ) auch zu einem biphasischen Verlauf in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Hierbei steigt  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  in G15 nach Zugabe von FCCP zunächst von  $192 \pm 28 \text{ nM}$  auf  $520 \pm 39 \text{ nM}$  an ( $P \leq 0,001$ ;  $n=5$ ) und sinkt danach auf  $146 \pm 15 \text{ nM}$  ab ( $P \leq 0,001$ ;  $n=5$ ; Abb. 4.24A). Entleert man das ER und verhindert die Calciumwiederaufnahme durch Vorinkubation mit CPA, so kommt es dennoch zu einer Freisetzung in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Abb. 4.24B,  $n=13$ ). Dabei steigt  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  in G15 + CPA ( $10 \mu\text{M}$ ) von  $220 \pm 13 \text{ nM}$  auf  $505 \pm 21 \text{ nM}$  nach Zugabe von FCCP ( $P \leq 0,001$ ;  $n=13$ ) und fällt dann auf ein Plateau von  $154 \pm 11 \text{ nM}$  ab ( $P \leq 0,001$ ;  $n=13$ ).

Das bedeutet, dass es trotz leerer intrazellulärer Calciumspeicher (ER) zu einer Calciumfreisetzung durch mitochondrielle Entkopplung in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen kommt. In SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen wird Calcium also entweder zusätzlich in einem anderen intrazellulären Kompartiment gespeichert (z.B. den Mitochondrien) und durch FCCP freigesetzt oder FCCP induziert in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen einen Calciumeinstrom.

Diese Beobachtung steht im Kontrast zu WT B-Zellen, deren Sekretion über den K<sub>ATP</sub>-Kanal reguliert wird und bei denen mitochondrielle Calciumspeicherung eine untergeordnete Rolle spielt. Möglicherweise kommt es durch Ausknocken des K<sub>ATP</sub>-Kanals zu einer Veränderung im Speicherverhalten der B-Zelle.

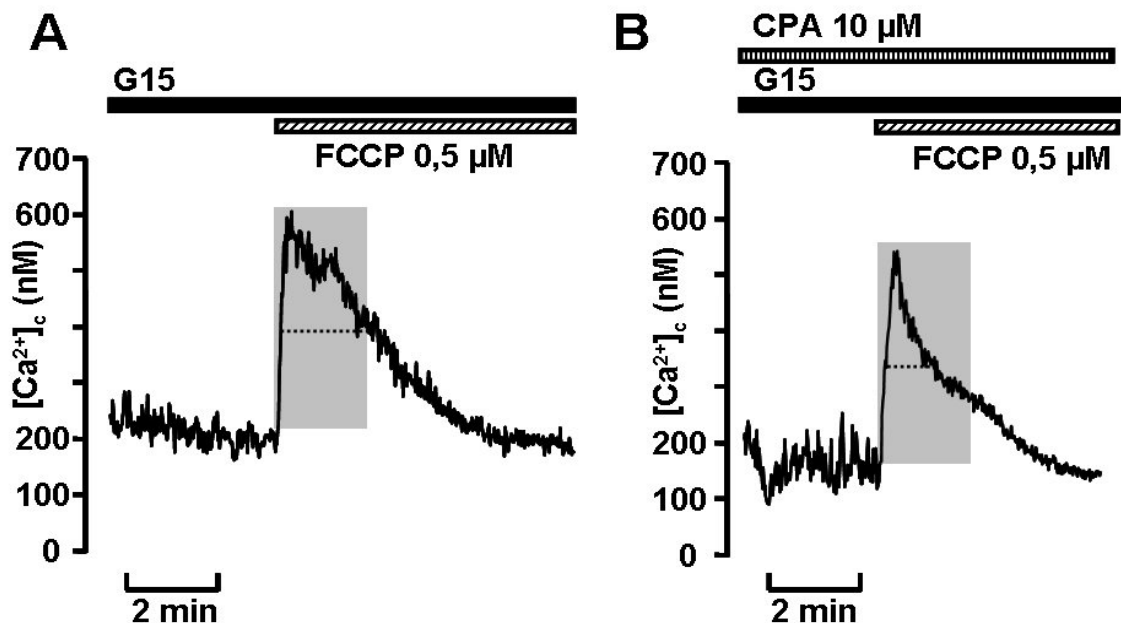


Abb. 4.24 In SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen kommt es zur Calciumfreisetzung durch FCCP (A, n=5). Im Gegensatz zu WT B-Zellen beobachtet man dies auch bei entleertem ER (B, n=13). Die Versuche wurden zum Teil von Dr. Martina Düfer durchgeführt. Die gestrichelte Linie zeigt die Peakhalbwertsbreite der Calciumfreisetzung an.

#### 4.7.3 Veränderte Calciumspeicherung in WT B-Zellen durch Tolbutamid

Um zu überprüfen, ob es durch Ausschalten des K<sub>ATP</sub>-Kanals zu einem veränderten Speicherverhalten in B-Zellen kommt, wurden die K<sub>ATP</sub>-Kanäle in B-Zellen aus WT Mäusen mit Tolbutamid (1 mM) gehemmt.

Induziert man nun durch FCCP (0,5 μM) eine Calciumfreisetzung, so ergibt sich analog zu den Experimenten mit SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen ein biphasischer Verlauf in  $[Ca^{2+}]_c$  (Abb.

4.25A). Zunächst steigt  $[Ca^{2+}]_c$  in G15 von  $309 \pm 20$  nM nach Zugabe von FCCP auf  $570 \pm 43$  nM ( $P \leq 0,001$ ;  $n=5$ ) an und sinkt anschließend auf ein Plateau von  $325 \pm 39$  nM ab ( $P \leq 0,05$ ;  $n=5$ ).

Werden die SERCAs mit CPA (10  $\mu$ M) gehemmt und die Mitochondrien mit FCCP (0,5  $\mu$ M) entkoppelt, so kommt es, analog zu den KO Experimenten, auch bei leerem ER in WT B-Zellen zu einer Calciumfreisetzung bei gehemmten  $K_{ATP}$ -Kanälen (Abb. 4.25B). Dabei steigt  $[Ca^{2+}]_c$  unter G15, Tolbutamid (1 mM) und CPA (10  $\mu$ M) von  $308 \pm 45$  nM auf  $483 \pm 62$  nM nach Zugabe von FCCP ( $P \leq 0,01$ ;  $n=5$ ), und sinkt dann auf ein Plateau von  $302 \pm 28$  nM ab ( $P \leq 0,05$ ;  $n=5$ ).

Dies bedeutet, dass gehemmte oder nicht vorhandene  $K_{ATP}$ -Kanäle in B-Zellen zu einer veränderten Calciumspeicherung in ein anderes intrazelluläres Kompartiment als das ER oder aber zu einem Calciumeinstrom führen. Am wahrscheinlichsten ist nach den bisher gezeigten Ergebnissen eine Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien. Ob dies zutrifft müsste durch direkte Messung des Calcium-Flux in und aus den Mitochondrien gezeigt werden.

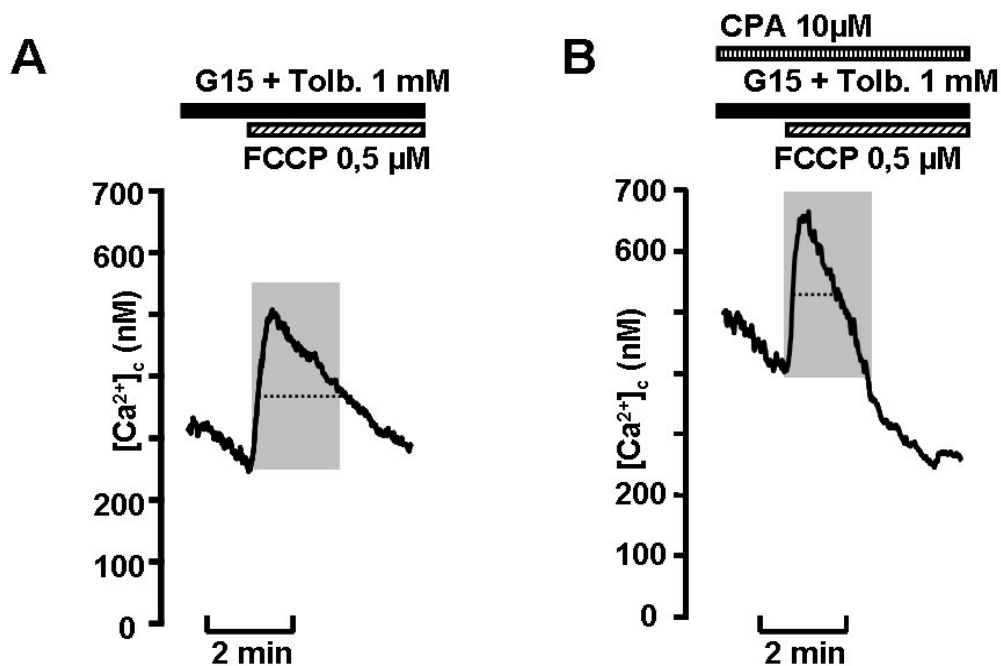


Abb. 4.25 FCCP-induzierter Anstieg in  $[Ca^{2+}]_c$  in WT B-Zellen, deren  $K_{ATP}$ -Kanäle durch Tolbutamid (1 mM) gehemmt wurden (A). Hemmung der SUR1-Untereinheit des  $K_{ATP}$ -Kanals (Tolbutamid 1mM) führt auch bei entleertem ER (CPA 10  $\mu$ M) zu einem Anstieg in  $[Ca^{2+}]_c$  in WT B-Zellen (B,  $n=5$ )

Ob es durch die Hemmung bzw. den Knockout der  $K_{ATP}$ -Kanäle zu einer zusätzlichen Calciumspeicherung in einem anderen Kompartiment als dem ER oder aber zu einer kompletten Umschaltung des Speicherverhaltens vom ER auf dieses Kompartiment kommt, lässt sich auf den ersten Blick nicht aussagen. Daher wurde für die FCCP-induzierte Freisetzung die Peakhalbwertsbreite bestimmt. Eine Quantifizierung der freigesetzten Menge durch Auswertung der AUC (Area under the curve = Fläche unter der Kurve) konnte aufgrund der unterschiedlichen Freisetzungskinetiken nicht eindeutig bestimmt werden. Die Peakhalbwertsbreite ist in den jeweiligen Abbildungen (4.23-4.25) als gestrichelte Linie dargestellt. In Abb. 4.26 sind die ermittelten Peakhalbwertsbreiten für die verschiedenen Experimente in Diagrammform aufgetragen. Hierbei zeigt sich, dass durch Knockout der SUR1-UE bzw. Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanäle durch Tolbutamid (1 mM), die Peakhalbwertsbreite der durch FCCP (0,5  $\mu$ M) ausgelösten Calciumfreisetzung, signifikant von  $32 \pm 4$  s (WT; n=6) auf  $80 \pm 18$  s (KO;  $P \leq 0,05$ ; n=5) bzw.  $89 \pm 10$  s (WT + Tolbutamid 1 mM;  $P \leq 0,001$ ; n=5) ansteigt. Hemmt man die Calciumaufnahme in das ER durch CPA (10  $\mu$ M), so reduziert sich die Peakhalbwertsbreite in den SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen von  $80 \pm 18$  s auf  $36 \pm 4$  s ( $P \leq 0,01$ ; n=5 bzw. 13). In WT B-Zellen, bei denen die  $K_{ATP}$ -Kanäle mit Tolbutamid (1 mM) gehemmt werden, sinkt die Peakhalbwertsbreite ebenfalls durch Vorinkubation mit CPA von  $89 \pm 10$  s auf  $35 \pm 7$  s ( $P \leq 0,01$ ; n=5).

Die durchgeführten Experimente zeigen deutlich, dass es in B-Zellen durch Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanäle mit Sulfonylharnstoffen wie Tolbutamid bzw. durch Ausknocken der SUR1-UE des  $K_{ATP}$ -Kanals zu einer zusätzlichen Calciumspeicherung in ein weiteres Kompartiment kommt. Möglicherweise findet diese Calciumspeicherung in den Mitochondrien statt.

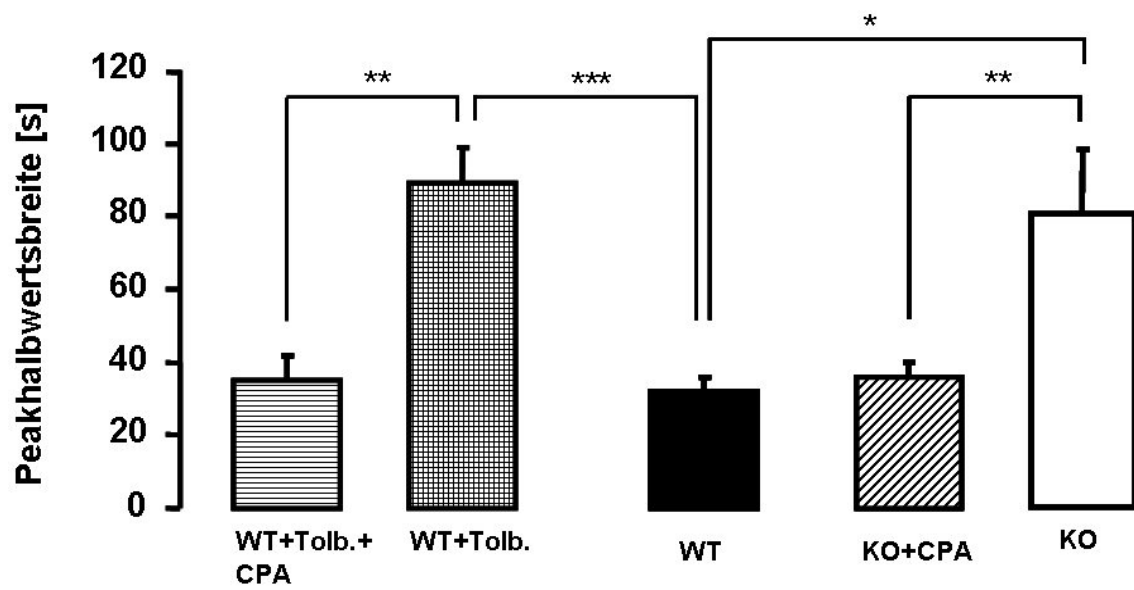


Abb. 4.26 zeigt die Peakhalbwidthen der durch FCCP-induzierten Calciumfreisetzung in WT bzw. KO ( $SUR1^{-/-}$ ) B-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die mit \* gekennzeichneten Wertepaare sind signifikant unterschiedlich. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$

## 5 Diskussion

### 5.1 Insulinsekretion in SUR1<sup>-/-</sup> Mäusen

K<sub>ATP</sub>-Kanäle nehmen in der Stimulus-Sekretions-Kopplung der B-Zelle eine Schlüsselposition ein. Sie wandeln das metabolische Signal, ausgelöst durch den Glucosemetabolismus der Zelle, in ein elektrisches Signal um und regulieren dadurch den Calciumeinstrom der B-Zelle. Dieser ist wiederum essentiell für die Insulinsekretion (Ashcroft und Rorsman 1989). Diese Signalkaskade ist als triggering pathway bekannt geworden. Henquin führte zusätzlich den Begriff des amplifying pathway ein (2000). Dieser ist anders als der triggering pathway unabhängig von Veränderungen des Plasmamembranpotentials und des K<sub>ATP</sub>-Kanals (Gembal et al. 1992, Sato et al. 1992). Mäuse denen die regulatorische Untereinheit SUR1(ABCC8) oder die porenbildende Untereinheit Kir6.2(KCNJ11) des K<sub>ATP</sub>-Kanals fehlt, exprimieren keine funktionsfähigen K<sub>ATP</sub>-Kanäle in B-Zellen (Miki et al. 1999, Seghers et al. 2000). Daher stellen sie geeignete Modelle dar, um die Bedeutung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle für die B-Zellen zu untersuchen. Insbesondere ihre Rolle bei der metabolischen und hormonellen Regulation der Insulinsekretion und ihre Funktion bei den Oszillationen sind von besonderer Bedeutung.

SUR1<sup>-/-</sup> Mäuse haben im gefütterten Zustand normale Blutzuckerkonzentrationen, die denen von WT Tieren gleichen (siehe Kap. 4.3). Mutationen in Genen, die für den K<sub>ATP</sub>-Kanal kodieren, führen beim Menschen hingegen zu einer übermäßigen Insulinsekretion bei gleichzeitiger Hypoglykämie. Dieses Krankheitsbild wird als PHHI (persistent hyperinsulinemic-hypoglycemia of infancy) oder nach neuerer Nomenklatur als HI (hypoglycemia of infancy) bezeichnet (Kane et al. 1996, Aguilar-Bryan und Bryan 1999). Mäuse sind also im Unterschied zu Menschen in der Lage, den Verlust der K<sub>ATP</sub>-Kanäle zu kompensieren und über einen noch unbekanntem K<sub>ATP</sub>-Kanal unabhängigen Mechanismus ihre Insulinsekretion zu regulieren.

Die bereits publizierten Daten zur glucoseinduzierten Insulinsekretion in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen sind jedoch zum Teil widersprüchlich und lassen sich aufgrund unterschiedlicher verwendeter Methoden nur unzureichend vergleichen. In den meisten Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass die basale Insulinsekretion aus SUR1<sup>-/-</sup> Inseln nicht erhöht und die glucoseinduzierte Insulinsekretion außerordentlich gering ist oder fast völlig fehlt (Seghers et al. 2000, Shiota et al. 2002, Nakazaki et al. 2002,

Doliba et al. 2004). Demgegenüber berichten Li et al. (2004) und Nenquin et al. (2004) von erhöhter basaler Insulinsekretion aus perfundierten SUR1<sup>-/-</sup> Inseln. Eliasson et al. (2003) und Nenquin et al. (2004) berichten zudem von einer glucoseinduzierten Insulinsekretion aus SUR1<sup>-/-</sup> Inseln.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestärkt die vermutete Theorie, dass die Insulinsekretion aus isolierten SUR1<sup>-/-</sup> Inseln (steady-state-Inkubation) in niedrigen Glucosekonzentrationen basal ist und durch steigende Glucosekonzentrationen erhöht werden kann (siehe Kap. 4.3; Haspel et al. 2005). Die Tiere sind demnach wahrscheinlich in der Lage auf einen Glucosereiz adäquate Mengen an Insulin zu sezernieren und so die Blutzuckerkonzentration zu kontrollieren.

## 5.2 Regulation von $V_m$ und Stimulus-Sekretions-Kopplung in B-Zellen aus SUR1<sup>-/-</sup> Mäusen

Misst man das Membranpotential mittels Patch-clamp Technik in der Ganzzelleableitung, so sind isolierte B-Zellen ohne funktionelle  $K_{ATP}$ -Kanäle dauerdepolarisiert und zeigen kontinuierlich Calciumaktionspotentiale (Miki et al. 1998, Seghers et al. 2000, Düfer et al. 2004). Dies beobachtet man auch in B-Zellen von Patienten, die an HI erkrankt sind (Kane et al. 1996). Isolierte B-Zellen bzw. B-Zell-Cluster ohne  $K_{ATP}$ -Kanäle zeigen ein uneinheitliches Muster in  $[Ca^{2+}]_c$ , das keine Korrelation zur eingesetzten Glucosemenge zeigt. Man beobachtet entweder ständig erhöhtes  $[Ca^{2+}]_c$  in Glucosekonzentrationen von 0,5 bis 15 mM oder interessanterweise Oszillationen (Miki et al. 1998, Shiota et al. 2002, Düfer et al. 2004). Die untersuchten B-Zellen in intakten Langerhans-Inseln zeigen weitgehend Oszillationen in  $[Ca^{2+}]_c$  (Ämmälä et al. 2000, Nenquin et al. 2004).

Die beobachteten Oszillationen in  $[Ca^{2+}]_c$  in B-Zellen aus SUR1<sup>-/-</sup> Mäusen bei gleichzeitiger Dauerdepolarisation in  $V_m$  führten zu der Annahme, dass in  $K_{ATP}$ -Kanal defizienten B-Zellen  $[Ca^{2+}]_c$  nicht mehr an  $V_m$  gekoppelt ist. Die Membranpotentialuntersuchungen wurden allerdings an isolierten B-Zellen durchgeführt. Oszillationen im Membranpotential lassen sich jedoch an isolierten B-Zellen nicht ableiten (Smith et al. 1990a, Ämmälä et al. 1991, Kinard et al. 1999). Möglicherweise bedarf es der interzellularen Kopplung über gap junctions wie sie in den Langerhans-Inseln vorliegt, um Oszillationen in  $V_m$  abzuleiten. Auch konnte

gezeigt werden, dass sich das Oszillationsmuster in  $[Ca^{2+}]_c$  zwischen intakten Inseln und isolierten B-Zellen unterscheidet (Gilon et al. 2002).

Mittels der Mikroelektrodenteknik kann man B-Zellen untersuchen, die noch in einem funktionellen Verband der Langerhans-Insel, umgeben von exokrinem Gewebe und Blutgefäßen, eingebettet sind. Mittels dieser Technik leitet man zuverlässig Oszillationen des Membranpotential in WT B-Zellen ab, wenn diese mit Glucose stimuliert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch  $K_{ATP}$ -Kanal defiziente B-Zellen der Maus Oszillationen in  $V_m$  zeigen (siehe Kap. 4.1), wenn es in intakten Inseln gemessen wird. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass B-Zellen ohne  $K_{ATP}$ -Kanäle nicht dauerdepolarisiert sind. Dies war ein erster Hinweis, dass B-Zellen aus  $SUR1^{-/-}$  Mäusen ihre Insulinsekretion ähnlich der WT B-Zellen über die elektrische Aktivität regulieren.

Diese interessante Beobachtung lässt den Schluss zu, dass es in B-Zellen der Maus einen zweiten Oszillationsmechanismus gibt. Dieser zweite Mechanismus ist in der Lage die Funktion des ursprünglichen Oszillators zu übernehmen. Ähnlich dem Sinus- und AV-Knoten des Herzens scheint es in B-Zellen der Maus ein Prinzip der doppelten Sicherheit zu geben, das die übermäßige Insulinsekretion der  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen verhindert. In WT B-Zellen ist dieser sekundäre Oszillationsmechanismus höchstwahrscheinlich inaktiv, da man durch Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals in WT B-Zellen ohne Glucose keine dauerhaften Oszillationen in  $V_m$  induzieren kann (Henquin 1998), unter diesen Bedingungen (G0,5) im KO aber Oszillationen in  $V_m$  ableitet.

Bislang fehlen Untersuchungen mit der Mikroelektrodenteknik an intakten humanen Langerhans-Inseln aus Patienten, die an HI erkrankt sind. Möglicherweise finden sich dort keine Oszillationen sondern Dauerdepolarisation des Membranpotentials, wodurch erhöhtes  $[Ca^{2+}]_c$  und letztlich die übermäßige Insulinsekretion erklärt werden könnte. Dies könnte ein entscheidender Hinweis sein, um die Diskrepanz zwischen den  $SUR1^{-/-}$  Mäusen, die eine geregelte Insulinsekretion haben, und den PHHI-Patienten mit übermäßiger Insulinsekretion aufzuklären.

Es stellte sich nun die Frage, inwieweit Veränderungen der Glucosekonzentration zu einer Veränderung in  $V_m$  führen, folglich eine Glucoseabhängigkeit des Membranpotentials in den KO B-Zellen noch vorhanden ist. Hier konnte klar gezeigt werden, dass die strenge Kopplung des Membranpotentials an den Glucosemetabolismus durch den  $SUR1$ -KO verloren geht, da über einen Bereich von 0,5 bis 40 mM Glucose Oszillationen in  $V_m$  zu finden sind (siehe Kap. 4.1). Allerdings steigt die Frequenz der Calciumaktionspotentiale innerhalb der Burst-Phasen signifikant

mit steigender Glucosekonzentration, so dass man durchaus von einer Glucosemodulation des Membranpotentials sprechen kann.

Zu klären war nun, wie das Membranpotential ohne  $K_{ATP}$ -Kanäle gesteuert wird, so dass es zu Oszillationen, also zu einer regelmäßigen Abfolge von depolarisierten und repolarisierten Phasen, kommt. Die Depolarisation in den  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen, die zu den Burst-Phasen führt, lässt sich leicht nachvollziehen, da die Burst-Phasen in den  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen wie im WT durch Calciumaktionspotentiale getragen wird. Welcher Strom aber repolarisiert die  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen nach KO der  $K_{ATP}$ -Kanäle und somit Wegfall des  $K_{ATP}$ -Stromes, durch den in WT B-Zellen die Burst-Phase beendet wird?

Santos et al. (1993) beobachteten, dass in WT B-Zellen ein erhöhter Calciumeinstrom die Induktion eines hyperpolarisierenden Stromes zur Folge hat und dass diese Hyperpolarisation unabhängig vom  $K_{ATP}$ -Kanal abläuft. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Strom der als  $I_{K,slow}$  bezeichnet wird und zuerst von Göpel et al. (1999) beschrieben wurde. Dieser Strom hat eine im Vergleich zum  $K_{ATP}$ -Strom geringe Amplitude von  $28 \pm 2$  pA und wird durch  $Ca^{2+}$  aktiviert (Göpel et al. 1999). In  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen, die aufgrund des fehlenden  $K_{ATP}$ -Stromes einen hohen Membranwiderstand aufweisen, könnte demnach ein Strom mit vergleichsweise kleiner Amplitude zur Repolarisation führen und so an den beobachteten Oszillationen beteiligt sein.

In Patch-clamp Experimenten an intakten Langerhans-Inseln der Maus konnte  $I_{K,slow}$  nachgewiesen werden. Dabei wird in G5 (um elektrische Aktivität durch den Glucosemetabolismus auszuschließen) elektrische Aktivität simuliert um Burst-Phasen nachzuahmen. Dies wird dadurch erreicht, indem man einen Spannungssprung für 5s von -70 mV auf -40 mV induziert und dann eine Serie von 26 „Aktionspotentialen“, durch Spannungssprünge von -40 mV auf 0 mV und wieder zurück auf -40 mV mit einer Frequenz von 5 Hz, induziert. Mit diesem Manöver simuliert man eine Burst-Phase, die den glucoseinduzierten Burst-Phasen der B-Zelle ähnlich ist. Der dabei entstehende Kaliumstrom ist Nifedipin-sensitiv, also calciumabhängig.

Interessanterweise hat  $I_{K,slow}$  eine Tolbutamid-resistente Stromkomponente von ca. 52%, wenn er durch den simulierten Burst induziert wird (Kanno et al. 2002). In  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen kann durch Aufprägen von Aktionspotentialen ebenfalls ein Kaliumstrom induziert werden. Er wird durch Hemmung des Calciumeinstroms mit D600 vollständig gehemmt und verstärkt sich durch Erhöhen der Offenwahrscheinlichkeit für L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle mit BayK8644, ist folglich also calciumabhängig (Haspel et al. 2005).

Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich hierbei ebenfalls um  $I_{K,slow}$ , der bei Abwesenheit der  $K_{ATP}$ -Kanäle möglicherweise eine besondere Rolle bei den Oszillationen in  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen spielt, und für die Repolarisation der Bursts in B-Zellen ohne  $K_{ATP}$ -Kanäle verantwortlich sein könnte. Mikroelektrodenversuche, bei denen das Erhöhen der extrazellulären Calciumkonzentration von 2,5 auf 10 mM (erhöhter Calciumeinstrom in die B-Zelle) zu einer signifikanten Verlängerung der Interburst-Phasen in  $V_m$  führt, unterstützen diese These (siehe Kap. 4.4). Diesen liegt die Induktion eines hyperpolarisierenden Stromes, möglicherweise  $I_{K,slow}$ , zugrunde.

Die Kopplung zwischen Membranpotential und intrazellulärer Calciumkonzentration stellt eine wichtige Voraussetzung für eine geregelte Insulinsekretion dar. Daher war es von großem Interesse, ob auch in  $K_{ATP}$ -Kanal defizienten B-Zellen die intrazelluläre Calciumhomöostase von  $V_m$  reguliert werden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass 30 mM Kalium oder L-Arginin (10 mM) zum sofortigen Ende der Oszillationen in  $V_m$  führen. Sie depolarisieren die B-Zell-Membran dauerhaft. Depolarisiert man die Plasmamembran mit 30 mM Kalium oder L-Arginin (10 mM), überschreitet man das Schwellenpotential der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle und es kommt zu einem dauerhaften Calciumeinstrom in die B-Zelle (siehe Kap. 4.3).  $[Ca^{2+}]_c$  verhält sich also synchron zu  $V_m$ . Dies lässt den Schluss zu, dass auch in  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen  $[Ca^{2+}]_c$  von  $V_m$  gesteuert wird.

Der gesteigerte Calciumeinstrom während der Depolarisation durch L-Arginin bzw. Hoch-Kalium führt zu einer verstärkten Insulinsekretion (siehe Kap. 4.3). Hierdurch konnte aufgezeigt werden, dass in  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen ein  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängiger triggering pathway existiert, folglich das metabolische Glucosesignal über Modulationen der elektrischen Aktivität auf  $[Ca^{2+}]_c$  und demnach auf die Insulinsekretion übertragen werden kann.

Einen weiteren Mechanismus zur Beeinflussung der intrazellulären Calciumkonzentration stellt die ATP-abhängige Calciumaufnahme in das endoplasmatische Retikulum dar. Mehrere Arbeiten zeigen, dass durch Leerung des intrazellulären Calciumspeichers eine Depolarisation in  $V_m$  induziert werden kann und die Amplitude und Frequenz der Calciumoszillationen beeinflusst werden (Worley et al. 1994b, Liu et al. 1995, Arredouani et al. 2002).

Cyclopiazonsäure (CPA) und Thapsigargin (Thastrup et al. 1990) sind effektive Inhibitoren der SERCA, die für die Calciumaufnahme in das ER verantwortlich ist.

Cyclopiazonsäure ist im Gegensatz zu Thapsigargin ein reversibler Inhibitor (Goeger et al. 1988, Seidler et al. 1989). Er wurde in dieser Arbeit verwendet, um den Einfluss des ER für die Oszillationen in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen zu untersuchen.

Blockiert man die SERCAs, hemmt also die Calciumwiederaufnahme in dieses Kompartiment, so kommt es zunächst zur Calciumfreisetzung aus dem ER in das Cytosol.

CPA (10  $\mu$ M) führt zu Veränderungen des Membranpotentials in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen. Man beobachtet eine Zunahme der Bursts pro Minute, sowie eine Erhöhung der FOPP aufgrund signifikant kürzerer Interburst-Phasen bei unveränderten Burst-Phasen (siehe Kap. 4.5.1). Die Hemmung der SERCAs verursacht also eine verstärkte Depolarisation und dadurch auch Veränderungen in  $[Ca^{2+}]_c$ . Sie resultiert in einer Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration.

Um die Veränderungen in  $[Ca^{2+}]_c$  zu ermitteln, wurde die AUC der Calciummessungen bestimmt. Diese nimmt unter CPA (10  $\mu$ M) um ca. 52% im Gegensatz zur Kontrolle zu und korreliert mit der verstärkten Depolarisation nach SERCA-Blockade (siehe Kap. 4.5.2). Die durch CPA induzierte Erhöhung in  $[Ca^{2+}]_c$  wird durch Hemmung der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle mit D600 (100  $\mu$ M) nicht vollständig inhibiert. Nach Entfernen von Calcium aus der extrazellulären Badlösung, in Anwesenheit von D600, kann  $[Ca^{2+}]_c$  weiter gesenkt werden (siehe Kap. 4.5.2). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch CPA ein Calciumeinstrom induziert wird, der nicht durch L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle vermittelt wird.

Für elektrisch nicht erregbare Zellen wurde berichtet, dass die Leerung der intrazellulären Calciumspeicher den Calciumeinstrom über die Plasmamembran verstärkt. Den zugrunde liegenden Prozess nennt man kapazitiven Calciumeinstrom (Puntney JW jr. 1986, Putney und Bird 1993). In Mastzellen, in denen er zuerst entdeckt wurde, verläuft dieser Calciumeinstrom über spezifische Calciumkanäle. Diesen Strom durch die Calciumkanäle nennt man  $I_{CRAC}$  ( $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  current = durch Calciumspeicherleerung induzierter Calciumeinstrom (Hoth und Penner 1992, 1993). Später wurden weitere Kanäle mit verschiedener Ionenselektivität (Calcium, Kalium, Natrium) in unterschiedlichen Zelltypen beschrieben, die durch Speicherentleerung aktiviert werden (Parekh et al. 1993, Fasolato et al. 1994, Clapham 1996, Friel 1996, Hoth 1996). Sie wurden zu einer Familie zusammengefasst und als SOC (store operated channels = Speicher-gesteuerte Kanäle) bezeichnet. Hierzu zählt u.a. auch der CRAC-

Kanal, der ursprünglich in Mastzellen beschrieben wurde (Clapham 1996, Friel 1996, Hoth 1996).

Lange Zeit ging man davon aus, dass ausschließlich spannungsabhängige Calciumkanäle den Calciumeinstrom in elektrisch erregbaren Zellen regulieren. Worley et al. (1994a, 1994b) vermuteten zunächst, dass es sich bei dem speicherinduzierten Strom der B-Zelle um einen Natriumstrom handelt. Dies wurde jedoch von Miura et al. (1996) widerlegt. Ein Jahr später konnten diese dann zeigen, dass der speicherinduzierte Strom in WT B-Zellen tatsächlich ein Calciumstrom ist (Miura et al. 1997).

Dieser depolarisierende Calciumeinstrom könnte die verstärkte Depolarisation in  $V_m$  induzieren, die durch CPA in den SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen beobachtet wurde (siehe Kap. 4.5.1). Durch die verstärkte Depolarisation würde sich die Offenwahrscheinlichkeit der L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle erhöhen und dies würde insgesamt zu einem verstärkten Calciumeinstrom, der sich in einer gesteigerten Insulinsekretion widerspiegelt, führen (siehe Kap. 4.5.3).

In den vorliegenden Ergebnissen konnte die Kopplung zwischen Membranpotential und intrazellulärer Calciumkonzentration in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen nachgewiesen werden. Zudem zeigen diese, dass durch diese Kopplung die Insulinsekretion reguliert werden kann. Dies bedeutet, dass es einen  $K_{ATP}$ -unabhängigen triggering pathway in B-Zellen geben muss. Es konnte dargelegt werden, dass auf der einen Seite  $V_m$   $[Ca^{2+}]_c$  steuert, aber Veränderungen in  $[Ca^{2+}]_c$  seinerseits auf  $V_m$  rückkoppeln. Einmal die Induktion eines hyperpolarisierenden Stromes ( $I_{Kslow}$ ) durch vermehrten Calciumeinstrom über die Plasmamembran und Aktivierung membranständiger Calcium-abhängiger Kanäle und andererseits durch Beeinflussung intrazellulärer Calciumspeicher die Induktion eines depolarisierenden Stromes. Möglicherweise spielen diese Ströme bei der Regulation der Oszillationen des Membranpotentials in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen eine Rolle.

### 5.3 Der transient drop

Für WT B-Zellen konnte gezeigt werden, dass ein Erhöhen der Glucosekonzentration von <3 mM auf über 10 mM initial zu einem kleinen transienten Abfall in  $[Ca^{2+}]_c$  führt, der als Phase 0 der glucoseinduzierten Calciumantwort bezeichnet wird (Grapengiesser et al. 1988a, Roe et al. 1993).

Das Erhöhen der Glucosekonzentration führt zur vermehrten ATP-Produktion. Dadurch kommt es zur verstärkten Aktivierung ATP-verbrauchender Prozesse, wie z.B. der ATP-abhängigen  $Ca^{2+}$ -Pumpe des ER (Gylfe 1989, Roe et al. 1994) und Aufnahme von Calcium in das Kompartiment, da in niedrigen Glucosekonzentrationen (3mM) in WT B-Zellen das ER teilweise entleert ist (Miura et al. 1997). Der Füllungszustand nimmt mit steigender Glucosekonzentration zu (Gylfe 1988, Yada et al. 1992, Roe et al. 1994). Alle bisher veröffentlichten Publikationen, die  $[Ca^{2+}]_c$  in  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen gemessen haben, zeigen übereinstimmend, dass es bei Erhöhen der Glucosekonzentration von <3 mM auf über 8 mM ebenfalls zu einem initialen, transienten Abfall in  $[Ca^{2+}]_c$  kommt, den ich als transient drop bezeichne (Shiota et al. 2002, Doliba et al. 2004, Nenquin et al. 2004, Düfer et al. 2004).

Der transient drop tritt unmittelbar nach Erhöhen der Glucosekonzentration auf. Dabei fällt die Calciumkonzentration sehr schnell auf einen basalen Wert. Nach ca. drei Minuten steigt  $[Ca^{2+}]_c$  wieder an und oszilliert im Anschluss daran bzw. ist längere Zeit erhöht. Im Gegensatz zu WT B-Zellen ist  $[Ca^{2+}]_c$  in  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen auch in niedrigen Glucosekonzentrationen erhöht bzw. oszilliert. Die Peak-Höhen entsprechen denen in stimulatorischer Glucosekonzentration. Während des transient drop wird also sehr rasch eine relativ große Menge Calcium aus dem Cytosol entfernt.

Zunächst wurde angenommen, dass der transient drop aufgrund einer Aktivierung der SERCAs auftritt, also analog zu der initialen Calciumabnahme in WT B-Zellen verläuft. Allerdings ist der Füllungszustand des ER aufgrund des erhöhten  $[Ca^{2+}]_c$  und des Zusammenhangs zwischen  $[Ca^{2+}]_c$  und ER-Füllung sicherlich in  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen in G<sub>0,5</sub> wesentlich höher als in WT B-Zellen. Außerdem ist die Calciummenge, die aus dem Cytosol befördert wird, wesentlich höher als in WT B-Zellen, so dass alleine diese Überlegungen gegen eine SERCA-Aktivierung sprachen.

In der Tat zeigen die Versuche mit SERCA-Inhibitoren (CPA und Thapsigargin), dass der transient drop – im Gegensatz zur Phase 0 in WT B-Zellen – selbst bei veränderter Calciumaufnahme ins ER noch vorhanden ist (siehe Kap. 4.6.2). Interessant ist auch die

Beobachtung, dass durch die SERCA-Inhibition der transient drop nicht etwa verringert ist, sondern  $[Ca^{2+}]_c$  auch auf basale Werte absinkt. Damit kann eine Beteiligung des ER beim transient drop ganz ausgeschlossen werden, so dass man zu dem Schluss kommen muss, dass der transient drop der SUR1<sup>-/-</sup> B-Zelle und die Phase 0 in WT B-Zellen völlig verschiedene Ursachen haben.

In B-Zellen kommt es nach Glucosestimulus zu einer Hyperpolarisation in  $\Delta\Psi$  (Duchen et al. 1993). Damit lässt sich die von Kennedy et al. (1996) in einer insulinsezernierenden B-Zelllinie beschriebene Calciumaufnahme in die Mitochondrien erklären. Mehrere Arbeitsgruppen haben beobachtet, dass die Calciumaufnahme in Mitochondrien sehr schnell abläuft und diese in der Lage sind größere Mengen Calcium aufzunehmen (Wendt-Gallitelli und Isenberg 1991, Miyata et al. 1991, Rizzuto et al. 1992,1993,1994). Die Calciumaufnahme läuft über einen Calciumuniporter, der sich in der inneren Mitochondrienmembran befindet (Gunter und Gunter 1994, Bernardi et al. 1999). Kirichok et al. (2004) identifizierten einen Kanal in der inneren Mitochondrienmembran, der eine  $K_m < 2$  nM für Calcium hat, einwärts-gleichrichtend und dadurch ideal für eine Calciumaufnahme in die Mitochondrien ist. Sie spekulierten, dass es sich bei diesem Ionenkanal um den mitochondriellen Calcium-Uniporter handelt. Damit wurde der erste Calcium-selektive, intrazelluläre Ionenkanal vollständig beschrieben.

Durch Hemmung der ATP-Produktion über Natriumazid oder FCCP lässt sich der transient drop verhindern (siehe Kap. 4.6.3). Es ist also durchaus denkbar, dass der transient drop der SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen eine Calciumaufnahme in die Mitochondrien darstellt, da die Unterbrechung der ATP-Produktion durch Natriumazid bzw. FCCP eine Depolarisation in  $\Delta\Psi$  zur Folge hat und somit die Calciumaufnahme in die Mitochondrien unterbunden wird. Allerdings sind durch die gehemmte ATP-Produktion auch alle ATP-verbrauchenden Prozesse (z.B. ATPasen) betroffen.

Durch die Steigerung des Glucosemetabolismus kommt es nicht nur zum transient drop, sondern auch zu einer transienten Hyperpolarisation in  $V_m$ , die zeitlich mit dem transient drop korreliert (siehe Kap. 4.6.4). Diese Hyperpolarisation wird nicht durch die Aktivierung von TEA<sup>+</sup>-sensitiven Kaliumkanälen ausgelöst. TEA<sup>+</sup> hat auch keinen Einfluss auf den transient drop in  $[Ca^{2+}]_c$  (siehe Kap. 4.6.5).

Da  $V_m$  und  $[Ca^{2+}]_c$  in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen noch gekoppelt sind, liegt die Vermutung nahe, dass die transiente Hyperpolarisation der Auslöser des transient drop sein könnte. Momentan lässt sich nicht sagen ob der transient drop ausschließlich durch die

transiente Hyperpolarisation in  $V_m$  induziert wird oder ob ebenfalls eine mitochondrielle Calciumaufnahme an der beobachteten transienten Abnahme in  $[Ca^{2+}]_c$  beteiligt ist.

Wie lässt sich nun eine transiente Hyperpolarisation der SUR1<sup>-/-</sup> B-Zelle durch Glucosestimulus erklären? Wird vermehrt positive Ladung aus der Zelle transportiert, so resultiert daraus ein hyperpolarisierender Strom. Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase transportiert drei Natriumionen aus der Zelle und zwei Kaliumionen in die Zelle. Netto resultiert also ein hyperpolarisierender Strom. Hemmt man die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase z.B. durch Ouabain (100 μM), so kommt es zu einer Depolarisation in WT B-Zellen (Henquin und Meissner 1982).

In der Tat hemmt Ouabain (1 mM) die durch gesteigerten Glucosemetabolismus ausgelöste transiente Hyperpolarisation in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen vollständig (siehe Kap. 4.6.6). Somit könnte eine Aktivierung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase die Ursache für die transiente Hyperpolarisation durch Glucosestimulus in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen sein.

In WT B-Zellen spielt der hyperpolarisierende Strom der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase wohl nur eine untergeordnete Rolle, da hier der  $K_{ATP}$ -Strom in niedrigen Glucosekonzentrationen für ein stabiles Ruhemembranpotential sorgt. Blockiert man allerdings den  $K_{ATP}$ -Kanal in WT B-Zellen mit Tolbutamid (1 mM) und verhindert man die Calciumaufnahme in das ER mit CPA (10 μM), so kann auch hier ein transient drop in  $[Ca^{2+}]_c$  bei der Steigerung der Glucosekonzentration beobachtet werden (siehe Kap. 4.6.6). Nun scheint der hyperpolarisierende Strom der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ausreichend zu sein um die Plasmamembran transient zu hyperpolarisieren.

SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen, denen die  $K_{ATP}$ -Kanäle fehlen und deren hyperpolarisierender Strom somit wegfällt, weisen dadurch einen höheren Membranwiderstand auf. Für Veränderungen des Membranpotentials sind nunmehr Ströme mit kleiner Amplitude (z.B. der Strom der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) ausreichend, um eine Depolarisation oder Hyperpolarisation in  $V_m$  auszulösen.

Es ist schon länger bekannt, dass Insulin in der Lage ist die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase zu aktivieren (Clausen und Flatman 1987). Daher ist es denkbar, dass die durch Glucosestimulus ausgelöste Insulinsekretion in den SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen, eine Aktivierung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase bewirkt und dadurch die transiente Hyperpolarisation in  $V_m$  ausgelöst wird, welche zum transient drop in  $[Ca^{2+}]_c$  führt. Gestützt wird diese These durch Patch-clamp Experimente an isolierten SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen bei denen Insulin zu einer Hyperpolarisation in  $V_m$  führt (Düfer et al. 2005 Abstract).

Ob die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase darüber hinaus eine Rolle bei den glucoseinduzierten Oszillationen in  $\text{SUR1}^{-/-}$  B-Zellen spielt, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

## 5.4 Veränderte Calciumspeicherung in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen

Die intrazelluläre Calciumkonzentration und speziell ihre Regulation ist ein wichtiger Bestandteil der Stimulus-Sekretions-Kopplung in B-Zellen. Dabei spielt der Calciumeinstrom von extrazellulär über L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle eine entscheidende Rolle. Allerdings tragen auch intrazelluläre Calciumspeicher zur Calciumhomöostase der B-Zelle bei.

An erster Stelle ist hier das endoplasmatische Retikulum (ER) zu nennen. Aufnahme und Freisetzung in und aus dem ER beeinflusst die glucoseinduzierten Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen (Gilon et al. 1999, Arredouani et al. 2002). Erste Arbeiten, bei denen der <sup>45</sup>Ca-Fluß gemessen wurde, zeigen, dass Glucose nicht nur ein Anstieg in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> durch L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vermittelt, sondern auch zu einer vermehrten Calciumaufnahme in IP<sub>3</sub>-sensitive Speicher (zu denen das ER gehört) führt (Hellman et al. 1986).

Ein intrazellulärer Calciumspeicher in der B-Zelle kann zum einen Calcium aus dem Cytosol puffern um eine Calciumüberladung zu verhindern, zum anderen die Calciummenge im Cytosol erhöhen um die Insulinsekretion zu steigern. Des Weiteren beeinflusst das ER auch das Membranpotential der B-Zelle, da eine Hemmung der SERCAs zu einer Depolarisation in V<sub>m</sub> führt (Gilon et al. 1999). Mitochondrien sind ebenfalls in der Lage Calcium zu speichern. An INS-1 Zellen wurde gezeigt, dass durch Anstieg in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> oder ATP, Calcium in Mitochondrien aufgenommen wird (Rutter et al. 1993).

Krippeit-Drews et al. (2000) stellten fest, dass es durch Hemmung der ATP-Produktion in den Mitochondrien mit FCCP oder Natriumazid, zum sofortigen Anstieg in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> der B-Zelle kommt. Da diese Calciumfreisetzung durch Vorinkubation mit Thapsigargin bzw. CPA vollständig verhindert wird, muss es sich um eine Calciumfreisetzung aus dem ER handeln (Krippeit-Drews et al. 2000, siehe Kap. 4.7.1). Somit gilt das ER in WT B-Zellen als Hauptcalciumspeicher.

Interessanterweise kommt es in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen auch bei blockierter Calciumaufnahme in das ER zu einem FCCP- bzw. Natriumazid-induzierten Anstieg in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> (siehe Kap. 4.7.2). Hemmt man in WT B-Zellen die SUR1-UE (durch Tolbutamid), so kann bei leerem ER ebenfalls ein Anstieg in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> durch FCCP induziert werden (siehe Kap. 4.7.3). Dieser Anstieg könnte entweder durch einen gehemmten Calciumtransport aus der Zelle oder durch zusätzliche Calciumspeicherung in anderen Zellkompartimenten als das ER (z.B. Mitochondrien, Lysosomen oder Vesikel) zustande kommen.

Für einen gehemmten Calciumtransport in den Extrazellulärraum spricht die Tatsache, dass die Zugabe von FCCP bzw. Natriumazid die ATP-Synthese hemmt. Durch die gehemmte ATP-Synthese können die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen der Plasmamembran dann weniger  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Cytosol transportieren. Dies könnte den beobachteten Anstieg in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , der durch FCCP bzw. Natriumazid ausgelöst wird, erklären. Gegen diese Theorie spricht jedoch zum einen, dass der Anstieg nur transient ist und nach Erreichen eines Peaks  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  wieder absinkt. Zum anderen kommt es in WT B-Zellen, bei denen durch 30 mM extrazelluläres Kalium die Zelle dauerdepolarisiert wird und so bei geöffneten L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen ein ungehinderter Calciumeinstrom über die Plasmamembran erfolgen kann durch FCCP und CPA nicht zu einem Anstieg in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Hemmt man allerdings zusätzlich die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle mit Tolbutamid, so kommt es zum sofortigen transienten Anstieg in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  analog der Experimente aus Kap. 4.7.1 (persönliche Mitteilung von Dr. Düfer).

Ein gehemmter Calciumtransport als Ursache der transienten, FCCP-induzierten Erhöhung in  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  aus  $\text{SUR1}^{-/-}$  bzw. WT B-Zellen mit gehemmten  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen ist daher unwahrscheinlich. Ebenso spricht die Kinetik des Calciumanstiegs eher für eine Freisetzung als für einen gehemmten Calciumtransport.

Es gibt mehrere Zellkompartimente in denen neben dem ER auch Calcium gespeichert werden kann: Mitochondrien, Lysosomen oder Vesikel. Alle diese Kompartimente finden sich auch in B-Zellen.

Durch den Einsatz von FCCP kommt es zum Abfall der ATP-Produktion. Somit sind auch alle ATP-abhängigen Prozesse der Zelle davon betroffen. ATPasen pumpen dann weniger  $\text{Ca}^{2+}$  in die entsprechenden Kompartimente, es kommt zur Freisetzung, falls dort durch die  $\text{SUR1}$ -Blockade  $\text{Ca}^{2+}$  gespeichert werden würde.

Es gibt mehrere Gründe die für eine vermehrte Calciumspeicherung der Mitochondrien sprechen:

- 1) An isolierten Mitochondrien ist deren Fähigkeit zur Calciumspeicherung mehrfach gezeigt worden (Lehninger et al. 1963, als review: Lehninger et al. 1978).
- 2) In insulinproduzierenden Zellen konnte gezeigt werden, dass  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  durch Glucose gesteigert werden kann (Rutter et al. 1993, Kennedy et al. 1996).
- 3) Mitochondrien sind an der physiologischen Regulation der Calciumhomöostase in verschiedenen Zelltypen wie Neuronen, Chromaffinzellen, Oligodendrozyten und T-Zellen beteiligt (Friel und Tsien 1994, Babcock et al. 1997, Herrington et al. 1996, Simpson und Russel 1996, Hoth et al 1997).

Daher ist es am Wahrscheinlichsten, dass die FCCP-induzierte Calciumfreisetzung von mitochondriellem Calcium bestimmt wird. Jedoch könnte nur die direkte Messung von  $[Ca^{2+}]_m$  dies eindeutig beweisen. Die Versuche zeigen, dass die B-Zellen immer dann Calcium in den Mitochondrien speichern, wenn SUR1 ausgeknockt oder pharmakologisch blockiert wird.

Folgende Beobachtungen unterstützen diese These:

- 1) Die durch FCCP freigesetzte Calciummenge ist in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen deutlich höher als in WT B-Zellen.
- 2) In WT B-Zellen, bei denen die SUR1-UE durch Tolbutamid blockiert wurde, kommt es zu einer höheren Calciumfreisetzung als in B-Zellen ohne Tolbutamid, vergleichbar zu SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen.
- 3) Entleert man das ER in WT B-Zellen und hemmt SUR1 mit Tolbutamid, so nimmt die freigesetzte Calciummenge ab und ist vergleichbar der Menge in WT B-Zellen ohne Tolbutamid. Das bedeutet, dass die Mitochondrien neben dem ER nun als zusätzlicher Calciumspeicher von der Zelle rekrutiert werden und es nicht zu einem Umschalten der Ca<sup>2+</sup>-Speicherung von ER zu Mitochondrien kommt, wenn SUR1 ausgeknockt oder durch Tolbutamid gehemmt wird.

In SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen ist  $[Ca^{2+}]_c$  insgesamt höher als in WT B-Zellen (Shiota et al. 2002, Düfer et al. 2004, Doliba et al. 2004, Nenquin et al. 2004). Es könnte also sein, dass aufgrund der erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration die Mitochondrien lediglich vermehrt Calcium aufnehmen um die Zelle vor einer Überladung zu schützen und dies daher nur sekundär auf die Beeinflussung der SUR1-UE zurückzuführen ist.

Studien, bei denen in WT B-Zellen  $[Ca^{2+}]_c$  durch G40 bzw. L-Arginin (10 mM) konstant erhöht wurde und gleichzeitig das ER durch CPA geleert wurde, zeigen dass FCCP in beiden Fällen nicht in der Lage war eine Calciumfreisetzung zu induzieren. Wurde allerdings zusätzlich Tolbutamid eingesetzt, so kam es zur Calciumfreisetzung (persönliche Mitteilung von Dr. Düfer). Dies bedeutet, dass nicht die erhöhte Calciumkonzentration der Zelle sondern in der Tat die Beeinflussung der SUR1-UE für die Rekrutierung der Mitochondrien als Calciumspeicher verantwortlich ist.

Allerdings muss nun geklärt werden wie es durch den SUR1<sup>-/-</sup> bzw. die Hemmung des K<sub>ATP</sub>-Kanals zur Calciumspeicherung in den Mitochondrien kommen kann.

Eine Erklärung bietet die Hypothese von Eliasson et al. (2003), die postulieren, dass SUR1 mit intrazellulären Organellen interagiert und so deren Funktion beeinflusst. In ihrer Studie stellten sie ein Modell vor, bei dem SUR1 der Plasmamembran mit dem

cAMP-Rezeptor-Protein cAMPGEFII (Epac2) und anderen Exozytose regulierenden Proteinen Insulin sezernierender Vesikel interagiert.

Zusammen mit der Beobachtung, dass cAMPGEFII in INS-1 Zellen bei der calciuminduzierten Calciumfreisetzung (CICR) beteiligt sein soll (Kang et al. 2001), wäre eine weitere Rolle (neben der Ausbildung der  $K_{ATP}$ -Kanäle) für SUR1 in B-Zellen denkbar: die Regulation der Calciumspeicherung in intrazelluläre Organellen, möglicherweise über cAMPGEFII.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Stimulus-Sekretions-Kopplung und Regulation der Insulinsekretion  $K_{ATP}$ -Kanal defizienter B-Zellen durchgeführt. Die  $SUR1^{-/-}$  Maus ist dafür ein geeignetes Modell. Im Gegensatz zu  $K_{ATP}$ -Kanal-Mutationen beim Menschen, die eine schwere Stoffwechselstörung zur Folge haben, ist die  $SUR1^{-/-}$  Maus in der Lage den  $K_{ATP}$ -Kanal Verlust zu kompensieren. Erkenntnisse über die Mechanismen der Insulinsekretion in  $K_{ATP}$ -Kanal defizienten B-Zellen, ermöglichen neue Therapieoptionen für Erkrankungen, bei denen der  $K_{ATP}$ -Kanal betroffen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Erkenntnisse hinzugewonnen:

- $SUR1^{-/-}$  B-Zellen zeigen Oszillationen in  $V_m$ , wenn sie in ihrem funktionellen Verband der Insel liegen und mit der Mikroelektrode gemessen werden.
- In  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen ist  $V_m$  nicht mehr eng an den Glucosemetabolismus gekoppelt, wie aus WT B-Zellen bekannt. Allerdings zeigen auch  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen glucoseabhängige Modulationen in  $V_m$ .
- $V_m$ ,  $[Ca^{2+}]_c$  und Insulinsekretion sind auch in  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen gekoppelt, d.h. der triggering pathway existiert nach wie vor. Eine durch  $V_m$  induzierte Steigerung in  $[Ca^{2+}]_c$  hat auch eine gesteigerte Insulinsekretion zur Folge.
- Veränderungen in  $[Ca^{2+}]_c$  beeinflussen  $V_m$ . Zum einen wird durch Erhöhen der extrazellulären Calciumkonzentration ein hyperpolarisierender Strom induziert. Zum anderen kommt es durch Beeinflussung intrazellulärer Calciumspeicher (ER) zu einem depolarisierenden Calciumeinstrom, der nicht durch L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle vermittelt wird.
- In  $SUR1^{-/-}$  B-Zellen kommt es durch Steigerung der ATP-Produktion zu einer transienten Hyperpolarisation und einem transienten Abfall in  $[Ca^{2+}]_c$  (transient drop). Die Hyperpolarisation wird wahrscheinlich durch die Aktivierung der  $Na^+/K^+$ -ATPase ausgelöst. Dadurch kommt es zum Schließen der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle und zum transient drop in  $[Ca^{2+}]_c$ .
- Durch Ausschalten der SUR1-UE (Knockout oder pharmakologische Blockade durch Sulfonylharnstoffe) kommt es zu einer zusätzlichen Calciumspeicherung in einem anderen Kompartiment als dem ER, vermutlich den Mitochondrien der B-Zelle. Damit ändert sich das klassische Speicherverhalten der B-Zelle (nur ER) bei Beeinflussung der SUR1-UE.

## 7 Ausblick

Um die Regulation  $K_{ATP}$ -Kanal defizienter B-Zellen besser zu verstehen, wäre es von großer Bedeutung, die den Oszillationen zugrunde liegenden Ströme zu charakterisieren: Insbesondere den hyperpolarisierenden Strom der SUR1<sup>-/-</sup> B-Zelle, der die Burst-Phase beendet bzw. das Potential während der Interburst-Phasen aufrecht erhält. Zu klären wäre hier vor allem, ob eventuell eine Hochregulierung bestimmter Kaliumkanäle den  $K_{ATP}$ -Verlust teilweise kompensiert. Daneben müsste untersucht werden welcher Kanal durch den verstärkten Einstrom von Calcium über die Membran aktiviert wird und so die beobachtete Hyperpolarisation auslöst.

Weiterhin wirft die Annahme, dass die transiente Aktivierung der  $Na^+/K^+$ -ATPase zum transient drop führt, weitere Fragen auf: Wird der Effekt durch Insulin vermittelt und wirkt Insulin dabei über Interaktion mit dem Insulinrezeptor oder führt eine direkte Interaktion mit der  $Na^+/K^+$ -ATPase zur Aktivierung?

Weiterhin ist noch offen, ob die  $Na^+/K^+$ -ATPase für die glucoseinduzierten Oszillationen in SUR1<sup>-/-</sup> B-Zellen eine Rolle spielt.

Durch die Entdeckung des veränderten Speicherverhaltens nach KO bzw. pharmakologischer Hemmung der SUR1-UE des  $K_{ATP}$ -Kanals ergeben sich neue Fragen bezüglich der Therapie mit Sulfonylharnstoffen: Ist hier der Schlüssel zum Sekundärversagen der Sulfonylharnstoffe zu finden? Führt die SUR1-induzierte mitochondrielle Calciumspeicherung zu einer verstärkten Apoptose der B-Zelle?

Um neue Erkenntnisse der Calciumhomöostase der Mitochondrien zu gewinnen, wäre es wichtig Calcium-Imaging an Mitochondrien durchzuführen. Um dies auch an primär kultivierten B-Zellen und insbesondere bei Knockout-Tiermodellen anwenden zu können müsste man ein Gen, das für einen geeigneten Fluoreszenzmarker kodiert, der spezifisch in den Mitochondrien bindet (z.B. an Cytochrom c Oxidase), mittels eines viralen Shuttle in die B-Zelle transportieren, da alle bisher bekannten, nicht viralen Transfektionsmethoden für primäre B-Zellen ungeeignet sind.

Die Expression von mitoPericam (Nagai et al. 2001) wäre hierzu geeignet. MitoPericam ist ein Genkonstrukt, das für einen Fluoreszenzfarbstoff kodiert, der selektiv in Mitochondrien exprimiert wird und mit dem die Calciumkonzentration in Mitochondrien gemessen werden kann. Als viralen Shuttle eignen sich Baculoviren, für

die gezeigt wurde, dass sich B-Zellen damit transduzieren lassen (Ma et al. 2000). Sie bieten gegenüber anderen Viren entscheidende Vorteile: Zum einen ist die Herstellung rekombinanter Baculoviren wesentlich kostengünstiger als z.B. rekombinanter Adenoviren. Daneben fallen Baculoviren im Vergleich zu allen anderen für die Transfektion von B-Zellen möglichen Viren nur unter die Sicherheitsstufe 1 nach Gentechnikgesetz und sind nicht humanpathogen. Schließlich ist die Kultur der Wirtszellen (sf9 Insektenzellen) zur Herstellung rekombinanter Baculoviren vergleichsweise einfach zu handhaben.

## 8 Literaturverzeichnis

Abernethy DR, Soldatov NM (2002)

Structure-functional diversity of human L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel: perspectives for new pharmacological targets. *J Pharmacol Exp Ther.* 300: 724-8.

Abraham MR, Selivanov VA, Hodgson DM, Pucar D, Zingman LV, Wieringa B, Dzeja PP, Alekseev AE, Terzic A (2002)

Coupling of cell energetics with membrane metabolic sensing. Integrative signaling through creatine kinase phosphotransfer disrupted by M-CK gene knock-out. *J Biol Chem* 277: 24427-24434

Ämmälä C, Larsson O, Berggren PO, Bokvist K, Juntti-Berggren L, Kindmark H, Rorsman P (1991)

Inositol triphosphate-dependent periodic activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  conductance in glucose-stimulated pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* 353: 849-852

Ämmälä C, Ashcroft FM, Rorsman P (1993a)

Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single  $\beta$ -cells. *Nature* 363: 356-358

Ämmälä C, Bokvist K, Larsson O, Berggren PO, Rorsman P (1993b)

Demonstration of a novel apamin-insensitive calcium-activated  $\text{K}^{+}$  channel in mouse pancreatic B cells. *Pflügers Archiv - Eur J Physiol* 422: 443-448

Ämmälä C, Eliasson L, Bokvist K, Berggren PO, Honkanen RE, Sjöholm A, Rorsman P (1994)

Activation of protein kinases and inhibition of protein phosphatases play a central role in the regulation of exocytosis in mouse pancreatic  $\beta$  cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4343-4347

Ämmälä C, Dukes ID, Gengo P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seghers V, Nakazaki M (2000)

Spontaneous oscillations in cytosolic calcium in islets from knockout mice lacking the sulphonylurea receptor-1 (SUR1). *Diabetes.* 49 (Suppl1): A62 (Abstract)

Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP 4th, Boyd AE 3rd, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J und Nelson DA (1995)

Cloning of the  $\beta$  cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268: 423-426

Aguilar-Bryan L, Bryan J (1999)

ATP-sensitive potassium channels, sulfonylurea receptors, and persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Diabetes Rev* 4: 336-346

- Aguilar-Bryan L, Clement JP, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J (1998)  
Toward understanding the assembly and structure of  $K_{ATP}$  channels. *Physiol Rev.* 78: 227-45
- Ammon HP, Hägele R, Youssif N, Eujen R, El-Amri N (1983)  
A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release. *Endocrinology* 112: 720-726
- Ammon HP, Wahl MA (1994)  
Islet redox ratios: Their role in insulin release. In *Frontiers of insulin secretion and pancreatic B-cell research*, Flatt PR und Lenzen S, Smith Gordon: 113-122
- Andreu E, Soria B, Sanchez-Andres JV (1997)  
Oscillation of gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol.* 498: 753-61
- Arikkath J, Campbell KP (2003)  
Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13: 298-307
- Arkhammar P, Juntti-Berggren L, Larsson O, Welsh M, Nanberg E, Sjöholm A, Kohler M, Berggren PO (1994)  
Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function to the  $\beta$ -cell voltage-activated  $Ca^{2+}$  channels. *J Biol Chem* 269: 2743-2749
- Arredouani A, Henquin JC, Gilon P (2002)  
Contribution of the endoplasmic reticulum to the glucose-induced  $[Ca^{2+}]_c$  response in mouse pancreatic islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: 982-991
- Ashcroft FM, Rorsman P (1989)  
Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54: 87-143
- Ashcroft FM, Proks P, Smith PA, Ämmälä C, Bokvist K, Rorsman P (1994)  
Stimulus-secretion coupling in pancreatic  $\beta$  cells. *J Cell Biochem* 55 Suppl: 54-6
- Ashcroft FM, Gribble FM (1999)  
ATP-sensitive  $K^+$  channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 42: 903-919
- Ashcroft SJ, Weerasinghe LC, Randle PJ (1973)  
Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release. *Biochem J* 132: 223-231

- Atwater I, Ribalet B, Rojas E (1978)  
Cyclic changes in potential and resistance of the  $\beta$ -cell membrane induced by glucose in islets of Langerhans from mouse. *J Physiol* 278: 117-139
- Atwater I, Dawson CM, Ribalet B, Rojas E (1979a)  
Potassium permeability activated by intracellular calcium ion concentration in the pancreatic  $\beta$ -cell. *J Physiol* 288: 575-588
- Atwater I, Ribalet B, Rojas E (1979b)  
Mouse pancreatic  $\beta$ -cells: tetraethylammonium blockage of the potassium permeability increase induced by depolarization. *J Physiol* 288: 561-574
- Atwater I, Rosario L, Rojas E (1983)  
Properties of the Ca-activated  $K^+$  channel in pancreatic  $\beta$ -cells. *Cell Calcium* 4: 451-461
- Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB, Hille B (1997)  
Mitochondrial participation in the intracellular  $Ca^{2+}$  network. *J. Cell. Biol.* 136: 833-844
- Babenko AP, Gonzalez G, Bryan J (1999)  
The tolbutamide site of SUR1 and a mechanism for its functional coupling to  $K_{ATP}$  channel closure. *FEBS Let* 459: 367-376
- Bäcker M (2005)  
Untersuchungen zur Rolle des Phosphocreatins in der Stimulus-Sekretions-Kopplung der B-Zelle des Pankreas, *Dissertationsschrift*, Universität Tübingen
- Barg S, Ma X, Eliasson L, Galvanovskis J, Göpel SO, Obermüller S, Platzer J, Renström E, Trus M, Atlas D, Striessnig J, Rorsman P (2001)  
Fast exocytosis with few  $Ca^{2+}$  channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. *Biophys J.* 81: 3308-23
- Bas F, Darendeliler F, Demirkol D, Bundak R, Saka N, Gunoz H (1999)  
Successful therapy with calcium channel blocker (nifedipine) in persistent neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 12: 873-8
- Beauvois MC, Arredouani A, Jonas JC, Rolland JF, Schuit F, Henquin JC, and Gilon P (2004)  
A typical  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release from a sarco-endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase 3-dependent  $Ca^{2+}$  pool in mouse pancreatic beta-cells. *J. Physiol. (Lond.)* 559, 141-156
- Berggren PO, Rorsman P, Efendic S, Östenson C-G, Flatt PR, Nilsson T, Arkhammer P, Junti-Berggren L (1992)  
Mechanism of action of entero-insular hormones, islet peptides and neural

- input on the insulin secretory process. In: *Flatt P.R. (ed.) Nutrient regulation of insulin secretion. Portland Press London, 289-318*
- Berggren PO, Yang SN, Murakami M, Efanov AM, Uhles S, Kohler M, Moede T, Fernstrom A, Appelskog IB, Aspinwall CA, Zaitsev SV, Larsson O, de Vargas LM, Fecher-Trost C, Weissgerber P, Ludwig A, Leibiger B, Juntti-Berggren L, Barker CJ, Gromada J, Freichel M, Leibiger IB, Flockerzi V (2004)  
Removal of Ca<sup>2+</sup> channel beta3 subunit enhances Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell*. 119: 273-84
- Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F (1999)  
Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem*. 264: 687-701
- Betsholtz C, Baumann A, Kenna S, Ashcroft FM, Ashcroft SJ, Berggren PO, Grupe A, Pongs O, Rorsman P, Sandblom J, Welsh M (1990)  
Expression of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in insulin-producing cells. Analysis by polymerase chain reaction. *FEBS Lett* 263: 121-126
- Bokvist K, Rorsman P, Smith PA (1990a)  
Effects of external tetraethylammonium ions and quinine on delayed rectifying K<sup>+</sup> channels in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol*. 423: 311-25
- Bokvist K, Rorsman P, Smith PA (1990b)  
Block of ATP-regulated and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in mouse pancreatic  $\beta$ -cells by external tetraethylammonium and quinine. *J Physiol* 423: 327-342
- Britsch S, Krippeit-Drews P, Lang F, Gregor M, Drews G (1995)  
Glucagon-like peptide-1 modulates Ca<sup>2+</sup> current but not K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> current in intact mouse pancreatic B-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 33-39
- Butler A, Wei AG, Baker K, Salkoff L (1989)  
A family of putative potassium channel genes in Drosophila. *Science* 243: 943-7.
- Cancela JM, Petersen OH (2002)  
Regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by multiple Ca<sup>2+</sup>-releasing messengers. *Diabetes* 51, Suppl. 3, S349-S357
- Catterall WA (2000)  
Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16: 521-55
- Clapham DE (1996)  
TRP is cracked but is CRAC TRP? *Neuron* 16: 1069-1072.

- Clausen T, Flatman JA (1987)  
Effects of insulin and epinephrine on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> and glucose transport in soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 252: E492-E499
- Clement JP 4<sup>th</sup>, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J (1997)  
Association and stoichiometry of K<sub>ATP</sub> channel subunits. *Neuron* 18: 827-838
- Cook DL, Perara E (1982)  
Islet electrical pacemaker response to  $\alpha$ -adrenergic stimulation. *Diabetes* 31: 985-990
- Cook DL und Hales CN (1984)  
Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature* 1984 311: 271-273
- Cook DL, Satin LS und Hopkins WF (1991)  
Pancreatic B cells are bursting, but how? *Trends Neurosci* 14: 411-414
- Cuong DV, Kim N, Joo H, Youm JB, Chung JY, Lee Y, Park WS, Kim E, Park YS, Han J (2005)  
Subunit composition of ATP-sensitive potassium channels in mitochondria of rat hearts. *Mitochondrion*. 5: 121-33.
- Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM (1968)  
Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83: 572-84
- Dean PM, Matthews EK (1968)  
Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* 219: 389-90
- Dean PM (1973)  
Ultrastructural morphometry of the pancreatic beta-cell. *Diabetologia* 9: 115-9
- Detimary P, Gilon P und Henquin JC (1998)  
Interplay between cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> and the ATP/ADP ratio: a feedback control mechanism in mouse pancreatic islets. *Biochem J* 333: 269-274
- Ding WG, He LP, Omatsu-Kanbe M, Kitasato H (1996)  
A possible role of the ATP-sensitive potassium ion channel in determining the duration of spike-bursts in mouse pancreatic beta-cells. *Biochim Biophys Acta*. 1279: 219-26.
- Doliba NM, Qin W, Vatamaniuk MZ, Li C, Zelent D, Najafi H, Buettger CW, Collins HW, Carr RD, Magnuson MA, Matschinsky FM (2004)  
Restitution of defective glucose-stimulated insulin release of sulfonylurea type 1 receptor knockout mice by acetylcholine. *AJP Endocrinol Metab* 286: E834-43

- Drews G, Debuysse A, Nenquin M, Henquin JC (1990)  
Galanin and epinephrine act on distinct receptors to inhibit insulin release by the same mechanisms including an increase in  $K^+$  permeability of the B-cell membrane. *Endocrinology* 126: 1646-1653
- Drucker DJ (2001)  
Minireview: the glucagon-like peptides. *Endocrinology* 142: 521-7
- Duchen MR, Smith PA, Ashcroft FM (1993)  
Substrate-dependent changes in mitochondrial function, intracellular free calcium concentration and membrane channels in pancreatic beta-cells. *Biochem J*. 294: 35-42
- Düfer M (2001)  
Untersuchungen zur Rolle der Mitochondrien bei den Oszillationen des Membranpotentials und der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration in B-Zellen des Pankreas, *Dissertationsschrift*, Universität Tübingen
- Düfer M, Krippeit-Drews P, Buntinas L, Siemen D, Drews G (2002a)  
Methyl pyruvate stimulates pancreatic  $\beta$ -cells by a direct effect on  $K_{ATP}$  channels, and not as a mitochondrial substrate. *Biochem J* 368: 817-825
- Düfer M, Krippeit-Drews P, Drews G (2002b)  
Inhibition of mitochondrial function affects cellular  $Ca^{2+}$  handling in pancreatic B-cells *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 444: 236-243
- Düfer M, Haspel D, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G (2004)  
Oscillations of membrane potential and cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in  $SUR1^{-/-}$  beta cells. *Diabetologia* 47:488-98
- Düfer M, Haspel D, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G (2005)  
Beeinflussung der elektrischen Aktivität  $K_{ATP}$ -Kanal-defizienter B-Zellen des Pankreas durch Insulin und intrazelluläre Speicher. *Diabetes und Stoffwechsel* 14 (Suppl 1): V40 (Abstract)
- Dukes ID, McIntyre MS, Mertz RJ, Philipson LH, Roe MW, Spencer B, Worley JF 3<sup>rd</sup> (1994)  
Dependence on NADH produced during glycolysis for  $\beta$ -cell glucose signaling. *J Biol Chem* 269: 10979-10982
- Dukes ID, Roe MW, Worley JF III, Philipson LH (1997)  
Glucose-induced alterations in  $\beta$ -cell cytoplasmic  $Ca^{2+}$  involving the coupling of intracellular  $Ca^{2+}$  stores and plasma membrane ion channels. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 4: 262-271

- Dunne MJ, Kane C, Shepherd RM, Sanchez JA, James RF, Johnson PR, Aynsley-Green A, Lu S, Clement JP 4th, Lindley KJ, Seino S, Aguilar-Bryan L (1997)  
Familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor. *N Engl J Med.* 336: 703-6
- Ebert R, Creutzfeldt W (1987)  
Gastrointestinal peptides and insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* 3: 1-26
- Eliasson L, Ma X, Renström E, Barg S, Berggren PO, Galvanovskis J, Gromada J, Jing X, Lundquist I, Salehi A, Sewing S, Rorsman P. (2003)  
SUR1 regulates PKA-independent cAMP granule priming in mouse pancreatic B-cells. *J Gen Physiol* 121:181-197
- Eto K, Tsubamoto Y, Terauchi Y, Sugiyama T, Kishimoto T, Takahashi N, Yamauchi N, Kubota N, Murayama S, Aizawa T, Akanuma Y, Aizawa S, Kasai H, Yazaki Y, Kadowaki T (1999)  
Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 283: 981-5
- Farber JL (1981)  
The role of calcium in cell death. *Life Sci* 29: 1289-1295
- Fasolato C, Innocenti B, Pozzan T (1994)  
Receptor-activated  $Ca^{2+}$  influx: how many mechanisms for how many channels?  
*Trends in Pharmacological Sciences* 15: 77-83
- Fatherazi S, Cook DL (1989)  
Effects of tetraethylammonium and quinine on ATP-sensitive and Ca-activated K channels in HIT cells. *Diabetes* 38: 95A
- Ferrer J, Wasson J, Salkoff L, Permutt MA (1996)  
Cloning of human pancreatic islet large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels (hSlo) cDNAs: evidence for high levels of expression in pancreatic islets and identification of a flanking genetic marker. *Diabetologia* 39: 891-898
- Findlay I, Dunne MJ, Ullrich S, Wollheim CB, Petersen OH (1985)  
Quinine inhibits  $Ca^{2+}$ -independent  $K^+$  channels whereas tetraethylammonium inhibits  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in insulin-secreting cells. *FEBS Lett* 185: 4-8
- Friel D, Tsien RW (1994)  
An FCCP-sensitive  $Ca^{2+}$  store in bullfrog sympathetic neurons and its participation in stimulus invoked changes in  $[Ca^{2+}]_i$ . *J. Neurosci.* 14: 4007-4024
- Friel DD (1996)  
TRP: its role in phototransduction and store operated  $Ca^{2+}$  entry. *Cell* 85: 617-619

- Gagerman E, Idahl LA, Meissner HP, Taljedal IB (1978)  
Insulin release, cGMP, cAMP, and membrane potential in acetylcholine-stimulated islets. *Am J Physiol* 235: E493-E500
- Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1990)  
Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem*. 265: 11083-90.
- Garcia ML, Galvez A, Garcia-Calvo M, King VF, Vazquez J, Kaczorowski GJ (1991)  
Use of toxins to study potassium channels. *J Bioenerg Biomembr*. 23: 615-46
- Gembal M, Gilon P und Henquin JC (1992)  
Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 89: 1288-1295
- German MS (1993)  
Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 1781-5
- Gilon P und Henquin JC (1992)  
Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J Biol Chem* 267: 20713-20720
- Gilon P, Shepherd RM, Henquin JC (1993)  
Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> as evidences in single pancreatic islets. *J Biol Chem* 268: 22265-22268
- Gilon P, Yakel J, Gromada J, Zhu Y, Henquin JC, Rorsman P (1997)  
G protein-dependent inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> currents by acetylcholine in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol*. 499 (Pt1): 65-76
- Gilon P, Arredouani A, Gailly P, Gromada J, Henquin JC (1999)  
Uptake and release of Ca<sup>2+</sup> by the endoplasmic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration triggered by Ca<sup>2+</sup> influx in the electrically excitable pancreatic B-cell. *J Biol Chem* 274: 20197-20205
- Gilon P, Ravier MA, Jonas JC, Henquin JC (2002)  
Control mechanisms of the oscillations of insulin secretion in vitro and in vivo. *Diabetes* 51 Suppl 1: S144-51
- Gimenez-Gallego G, Navia MA, Reuben JP, Katz GM, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1988)  
Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

85: 3329-33.

- Goeger DE, Riley RT, Dorner JW, Cole RJ (1988)  
Cyclopiazonic acid inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem Pharmacol.* 37: 978-81
- Göpel S, Kanno T, Barg S, Eliasson L, Galvanovskis J, Renström E, Rorsman P (1999)  
Activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels contributes to rhythmic firing of action potentials in mouse pancreatic  $\beta$  cells. *J Gen Physiol* 114: 759-770
- Göpel S, Kanno T, Barg S, Rorsman P (2000)  
Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting-cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol* 528: 497-507
- Goforth PB, Bertram R, Khan FA, Zhang M, Sherman A, Satin LS (2002)  
Calcium-activated  $\text{K}^+$  channels of mouse  $\beta$ -cells are controlled by both store and cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ : experimental and theoretical studies. *J Gen Physiol* 120: 307-322
- Grapengiesser E, Gylfe E, Hellman B (1988a)  
Dual effect of glucose on cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in single pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem Biophys Res Commun* 150: 419-425
- Grapengiesser E, Gylfe E, Hellman B (1988b)  
Glucose-induced oscillations of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in the pancreatic beta-cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 151: 1299-304
- Grapengiesser E, Berts A, Saha S, Lund PE, Gylfe E, Hellman B (1993)  
Dual effects of Na/K pump inhibition on cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in pancreatic beta-cells. *Arch Biochem Biophys* 300: 327-377
- Gribble FM, Tucker SJ, Haug T, Ashcroft FM (1998)  
MgATP activates the beta cell KATP channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7185-90.
- Gribble FM und Reimann F (2002)  
Pharmacological modulation of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels. *Biochem Soc Trans.* 30: 333-9
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985)  
A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450
- Guiot Y, Stevens M, Stiernet P, Rahier J, Henquin JC, Sempoux C (2005)  
Morphological localization of the sulphonylurea receptor 1 in human and rodent endocrine pancreas. *Diabetologia.* 48 (Suppl 1): A175, 474

- Gunter KK, Gunter TE (1994)  
Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 26: 471-85
- Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS, Gavin CE (1994)  
Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol* 267: C313- C339
- Gylfe E (1988)  
Glucose-induced early changes in cytoplasmic calcium of pancreatic beta-cells studied with time-sharing dual-wavelength fluorometry. *J Biol Chem.* 263: 5044-5048
- Gylfe E (1989)  
Glucose-induced buffering of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in the pancreatic  $\beta$ -cell - an artifact or a physiological phenomenon? *Biochem Biophys Res Commun* 159: 907-912
- Gylfe E, Hellman B (1987)  
External ATP mimics carbachol in initiating calcium mobilization from pancreatic b-cells conditioned by previous exposure to glucose. *British Journal of Pharmacology* 92: 281–289
- Hales CN, Milner RDG (1968)  
The role of sodium and potassium in insulin secretion from rabbit pancreas. *J Physiol* 194: 725–743
- Haspel D, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Drews G, Düfer M (2005)  
Crosstalk between membrane potential and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in beta cells from  $\text{Sur1}^{-/-}$  mice *Diabetologia* 48: 913-921
- Hedekov CJ (1980)  
Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol Rev* 60: 442-509
- Heilbronn LK, Rood J, Janderova L, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E, Smith SR (2004)  
Relationship between serum resistin concentrations and insulin resistance in nonobese, obese, and obese diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1844-8
- Hellman B, Petersson, Hellerström C (1964)  
The growth pattern of the endocrine pancreas in mammals. In *Structure and metabolism of the pancreatic islets*, Brolin S, Hellman B und Knutson H, Pergamon, Oxford: 45-60
- Hellman B, Gylfe E, Wesslén N (1986)  
Inositol 1,4,5-trisphosphate mobilizes glucose-incorporated calcium from pancreatic islets. *Biochemistry International* 13: 383–389

- Hellman B, Gylfe E (1986)  
Mobilization of different intracellular calcium pools after activation of muscarinic receptors in pancreatic beta-cells. *Pharmacology*. 32: 257-67
- Henquin JC (1978)  
D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells. *Nature* 271:271-3
- Henquin JC (1979)  
Opposite effects of intracellular Ca<sup>2+</sup> and glucose on K<sup>+</sup> permeability of pancreatic islet cells. *Nature* 5: 66-8
- Henquin JC (1990)  
Role of voltage- and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in the control of glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 416: 568-572
- Henquin JC (2000)  
Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49: 1751-1760
- Henquin JC (1998)  
A minimum of fuel is necessary for tolbutamide to mimic the effect of glucose on electrical activity in pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocrinology* 139: 993-998
- Henquin JC, Garcia MC, Bozem M, Hermans MP, Nenquin M (1988)  
Muscarinic control of pancreatic B cell function involves sodium-dependent depolarization and calcium influx. *Endocrinology* 122: 2134-42.
- Henquin JC, Meissner HP (1982)  
The electrogenic sodium-potassium pump of mouse pancreatic B-cells. *J Physiol*.332: 529-52.
- Henquin JC, Meissner HP (1984a)  
The ionic, electrical, and secretory effects of endogenous cyclic adenosine monophosphate in mouse pancreatic B cells: studies with forskolin. *Endocrinology* 115: 1125-1134
- Henquin JC, Meissner HP (1984b)  
Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. *Experientia*. 40: 1043-52
- Henquin JC, Nenquin M (1988)  
The muscarinic receptor subtype in mouse pancreatic B-cells. *FEBS Lett* 236: 89-92

- Herrington J, Park YB, Babcock DF, Hille B (1996)  
Dominant role of mitochondria in clearance of large  $\text{Ca}^{2+}$  loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron* 16: 219–228
- Hiriart M, Matteson DR (1988)  
 $\text{Na}^+$  channels and two types of Ca channels in rat pancreatic B cells identified with the reverse hemolytic plaque assay. *J Gen Physiol* 91, 617–639
- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V (1994)  
Molecular basis for  $\text{Ca}^{2+}$  channel diversity. *Annu Rev Neurosci.* 17: 399-418
- Hofmann F, Lacinová L, Klugbauer N (1999)  
Voltage-dependent calcium channels: From structure to function. *Rev. Phys. Biochem. Pharm.* 139: 33 – 86
- Holz GG, Leech CA, Heller RS, Castonguay M, Habener JF (1999)  
cAMP-dependent mobilization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic beta-cells. A  $\text{Ca}^{2+}$  signaling system stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37). *J. Biol. Chem.* 274: 14147–14156
- Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnic N (1998)  
Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med.* 4: 781-5
- Hoth M (1996)  
Depletion of intracellular calcium stores activates an outward potassium current in mast and RBL-1 cells that is correlated with CRAC channel activation. *FEBS Letters* 390: 285-288
- Hoth M, Penner R (1992)  
Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355: 298-299
- Hoth M, Penner R (1993)  
Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol.* 465: 359-86
- Hsu WH, Xiang HD, Rajan AS, Kunze DL, Boyd AE 3rd (1991)  
Somatostatin inhibits insulin secretion by a G-protein-mediated decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  entry through voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the beta cell. *J Biol Chem.* 266: 837-43
- Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V (1992)  
Calcium channel beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.* 11: 885-90

- Iezzi M, Eliasson L, Fukuda M, Wollheim CB (2005)  
Adenovirus-mediated silencing of synaptotagmin 9 inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent insulin secretion in islets. *FEBS Lett.* 579: 5241-6
- Ihara Y, Yamada Y, Fujii Y, Gono T, Yano H, Yasuda K, Inagaki N, Seino Y, Seino S (1995)  
Molecular diversity and functional characterization of voltage-dependent calcium channels (CACN4) expressed in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol.* 9: 121-30
- Inagaki N, Gono T, Clement JP 4<sup>th</sup>, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J (1995)  
Reconstruction of  $I_{\text{KATP}}$ : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270: 1166-1170
- Inagaki, N, Gono T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S (1996)  
A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels. *Neuron* 16: 1011-1017
- Ishii TM, Silvia C, Hirschberg B, Bond CT, Adelman JP, Maylie J (1997)  
A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11651-11656
- Islam MS, Leibiger I., Leibiger B, Rossi D, Sorrentino V, Ekström TJ, Westerblad H, Andrade FH, Berggren, PO (1998)  
In situ activation of the type 2 ryanodine receptor in pancreatic beta cells requires cAMP-dependent phosphorylation. *PNAS* 95: 6145–6150
- Jacobsson G, Bean AJ, Scheller RH, Juntti-Berggren L, Deeney JT, Berggren PO, Meister B (1994)  
Identification of synaptic proteins and their isoform mRNAs in compartments of pancreatic endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12487–12491
- Jocelyn PC (1972)  
Biochemistry of the SH group. *Academic press London*, p.10
- Johnson JD, Kuang S, Mislser S, Polonsky KS (2004)  
Ryanodine receptors in human pancreatic beta cells: localization and effects on insulin secretion. *FASEB J.* 18: 878–880
- Johnson JH, Newgard CB, Milburn JL, Lodish HF, Thorens B (1990)  
The high  $K_m$  glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol Chem.* 265: 6548-51

- Jones PM, Fyles JM, Persaud SJ, Howell SL (1987)  
Catecholamine inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced insulin secretion from electrically permeabilised islets of Langerhans. *FEBS Lett* 219: 139-144
- Kamb A, Iverson LE, Tanouye MA (1987)  
Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell*. 50: 405-13
- Kane C, Shepherd RM, Squires PE, Johnson PR, James RF, Milla PJ, Aynsley-Green A, Lindley KJ, Dunne MJ (1996)  
Loss of functional  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels in pancreatic  $\beta$ -cells causes persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Nat Med* 2: 1344-1347
- Kane C, Lindley K, Johnson P, James R, Milla P, Aynsley-Green A, Dunne MJ (1997)  
Therapy for persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. Understanding the responsiveness of beta cells to diazoxide and somatostatin. *J Clin Invest* 100: 1888-93
- Kang G, Chepurny OG, Holz GG (2001)  
cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in INS-1 pancreatic beta-cells. *J Physiol*. 536: 375-85.
- Kanno T, Rorsman P, Gopel SO (2002)  
Glucose-dependent regulation of rhythmic action potential firing in pancreatic beta-cells by  $\text{K}(\text{ATP})$ -channel modulation. *J Physiol*. 545: 501-7
- Keizer J und Smolen P (1991)  
Bursting electrical activity in pancreatic beta cells caused by  $\text{Ca}^{2+}$ - and voltage-inactivated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88: 3897-901
- Kellerer M, Rett K, Renn W, Groop L, Haring HU (1996)  
Circulating TNF-alpha and leptin levels in offspring of NIDDM patients do not correlate to individual insulin sensitivity. *Horm Metab Res*. 28: 737-43.
- Kennedy ED, Rizzuto R, Theler JM, Pralong WF, Bastianutto C, Pozzan T, Wollheim CB (1996).  
Glucose-stimulated insulin secretion correlates with changes in mitochondrial and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in aequorin-expressing INS-1 cells. *Journal of Clinical Investigation* 98: 2524-2538.
- Kieffer TJ (2004)  
Gastro-intestinal hormones GIP and GLP-1. *Ann Endocrinol (Paris)* 65: 13-21
- Kinard TA, de Vries G, Sherman A, Satin LS (1999)  
Modulation of the bursting properties of single mouse pancreatic  $\beta$ -cells by artificial conductances. *Biophys J* 76: 1423-1435

- Kindmark H, Köhler M, Brown G, Bränström R, Larsson O, Berggren PO (2001)  
Glucose-induced oscillations in cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration precede oscillations in mitochondrial membrane potential in the pancreatic beta-cell. *J Biol Chem.* 276: 34530-6
- Kiraly-Borri CE, Morgan A, Burgoyne RD, Weller U, Wollheim CB, Lang J (1996)  
Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein and N-ethylmaleimide-insensitive factors are required for  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated exocytosis of insulin. *Biochem J* 314:199–203
- Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004)  
The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature.* 427: 360-4
- Kjems LL, Ravier MA, Jonas JC, Henquin JC (2002)  
Do oscillations of insulin secretion occur in the absence of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in  $\beta$ -cells? *Diabetes* 51: S144-S151
- Kozak JA, Misler S, Logothetis DE (1998)  
Characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  current in insulin-secreting murine  $\beta\text{TC}$ -3 cells. *J Physiol* 509: 355-370
- Krippeit-Drews P, Britsch S, Lang F, Drews G (1994)  
Effects of SH-group reagents on  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  channel currents of pancreatic B-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 860-866
- Krippeit-Drews P, Zempel G, Ammon HP, Lang F, Drews G (1995)  
Effects of membrane-permeant and -impermeant thiol reagents on  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  channel currents of mouse pancreatic B cells. *Endocrinology* 136: 464-467
- Krippeit-Drews P, Düfer M, Drews G (2000)  
Parallel oscillations of intracellular calcium activity and mitochondrial membrane potential in mouse pancreatic B-cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 267: 179-83.
- Krippeit-Drews P, Bäcker M, Düfer M, Drews G (2003)  
Phosphocreatine as a determinant of  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel activity in pancreatic  $\beta$ -cells. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 445: 556-562
- Kukuljan M, Goncalves AA, Atwater I (1991)  
Charybdotoxin-sensitive  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channel is not involved in glucose-induced electrical activity in pancreatic  $\beta$ -cells. *J Membr Biol* 119: 187-195
- Lambert AE, Henquin JC, Malvaux P (1974)  
Cationic environment and dynamics of insulin secretion. IV. Effect of ouabain. *Horm Metab Res* 6: 470–475

- Lang DA, Matthews DR, Burnett M und Turner RC (1981)  
Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes* 30: 435-439
- Lantz KA, Kaestner KH (2005)  
Winged-helix transcription factors and pancreatic development. *Clin Sci (Lond)*. 108: 195-204
- Larsson O, Kindmark H, Bränström R, Fredholm B und Berggren PO (1996)  
Oscillations in  $K_{ATP}$  channel activity promote oscillations in cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  concentration in the pancreatic  $\beta$  cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5161-5165
- Lebrun P, Atwater I, Claret M, Malaisse WJ, Herchuelz A (1983)  
Resistance to apamin of the  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  permeability in pancreatic B-cells. *FEBS Lett* 161: 41-44
- Lenzen S, Panten U (1988)  
Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochem Pharmacol* 37: 371-378
- Lee JH, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Estrada E, Seip R, Orlova C, Mantzoros CS (2003)  
Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4848-56.
- Lehninger AL, Rossi CS, Greenawalt JW (1963)  
Respiration-dependent accumulation of inorganic phosphate and Ca ions by rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 10: 444-8
- Lehninger AL, Reynafarje B, Vercesi A, Tew WP (1978)  
Transport and accumulation of calcium in mitochondria. *Ann N Y Acad Sci*. 307: 160-76.
- Lembert N, Joos HC, Idahl LA, Ammon HP und Wahl MA (2001)  
Methyl pyruvate initiates membrane depolarization and insulin release by metabolic factors other than ATP. *Biochem J* 354: 345-350
- Li C, Buettger C, Kwagh J, Matter A, Daikhin Y, Nissim IB, Collins HW, Yudkoff M, Stanley CA, Matschinsky FM (2004)  
A signaling role of glutamine in insulin secretion. *J Biol Chem*. 279: 13393-401
- Ligon B, Boyd AE 3rd, Dunlap K (1998)  
Class A calcium channel variants in pancreatic islets and their role in insulin secretion. *J Biol Chem*. 273: 13905-11

- Liu YJ, Grapengiesser E, Gylfe E und Hellman B (1995)  
Glucose induces oscillations of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  in pancreatic  $\beta$ -cells without participation of the thapsigargin-sensitive store. *Cell Calcium* 18: 165-173
- Lou XL, Yu X, Chen XK, Duan KL, He LM, Qu AL, Xu T, Zhou Z (2003)  
 $\text{Na}^+$  channel inactivation: a comparative study between pancreatic islet beta-cells and adrenal chromaffin cells in rat. *J Physiol.* 548: 191-202
- Ma L, Tamarina N, Wang Y, Kuznetsov A, Patel N, Kending C, Hering BJ, Philipson LH (2000)  
Baculovirus-mediated gene transfer into pancreatic islet cells. *Diabetes.* 49: 1986-91
- MacDonald MJ (1981)  
High content of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in pancreatic islets and its inhibition by diazoxide. *J Biol Chem.* 256: 8287-90
- MacDonald MJ (1982)  
Evidence for the malate aspartate shuttle in pancreatic islets. *Arch Biochem Biophys.* 213: 643-9
- MacDonald MJ (1990)  
Elusive proximal signals of  $\beta$ -cells for insulin secretion. *Diabetes* 39: 461-466
- MacDonald PE, Salapatek AM, Wheeler MB (2002a)  
Glucagon-like peptide-1 receptor activation antagonizes voltage-dependent repolarizing  $\text{K}^+$  currents in  $\beta$ -cells: a possible glucose-dependent insulinotropic mechanism. *Diabetes* 51 Suppl 3: S443-S447
- MacDonald PE, Sewing S, Wang J, Joseph JW, Smukler SR, Sakellaropoulos G, Wang J, Saleh MC, Chan CB, Tsushima RG, Salapatek AM, Wheeler MB (2002b)  
Inhibition of  $\text{Kv}2.1$  voltage-dependent  $\text{K}^+$  channels in pancreatic  $\beta$ -cells enhances glucose-dependent insulin secretion. *J Biol Chem* 277: 44938-44945
- MacDonald PE, Wheeler MB (2003)  
Voltage-dependent  $\text{K}^+$  channels in pancreatic  $\beta$  cells: role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia* 46: 1046-4062
- Malaisse WJ, Hutton JC, Kawazu S, Herchuelz A, Valverde I, Sener A (1979)  
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXXV. The links between metabolic and cationic events. *Diabetologia* 16: 331-341
- Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F (1984)  
The role of cyclic AMP in insulin release. *Experientia* 40: 1068-1074

- Malaisse WJ, Sener A (1987)  
Glucose-induced changes in cytosolic ATP content in pancreatic islets. *Biochim Biophys Acta*. 927: 190-5
- Martin F, Moya F, Gutierrez LM, Reig JA, Soria B (1995)  
Role of syntaxin in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* 38:860–863
- Marty A (1989)  
The physiological role of calcium-dependent channels. *Trends Neurosci.* 12: 420-4.
- Matschinsky FM, Pagliara AS, Stillings SN, Hover BA (1976)  
Glucose and ATP levels in pancreatic islet tissue of normal and diabetic rats. *J Clin Invest* 58: 1193-1200
- Matschinsky F, Liang Y, Kesavan P, Wang L, Froguel P, Velho G, Cohen D, Permutt MA, Tanizawa Y, Jetton TL (1993)  
Glucokinase as pancreatic  $\beta$  cell glucose sensor and diabetes gene. *J Clin Invest* 92: 2092-2098
- Meissner HP, Henquin JC, Preissler M (1978)  
Potassium dependence of the membrane potential of pancreatic B-cells. *FEBS Lett* 94: 87-89
- Meissner T, Beinbrech B, Mayatepek E (1999)  
Congenital hyperinsulinism: molecular basis of a heterogeneous disease. *Hum Mutat.* 13: 351-61
- Meister A (1988)  
Glutathione. In: Arias IM, Jacoby WB, Popper D, Schlachter D, Schafritz DA (eds) *The liver: biology and pathobiology*, Raven Press Ltd, New York, 401-417
- Mertz RJ, Worley JF, Spencer B, Johnson JH, Dukes ID (1996)  
Activation of stimulus-secretion coupling in pancreatic  $\beta$ -cells by specific products of glucose metabolism. Evidence for privileged signaling by glycolysis. *J Biol Chem* 271: 4838-4845
- Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M (1985)  
Charybdotoxin, a protein inhibitor of single  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313: 316-318
- Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J, Seino S (1998)  
Defective insulin secretion and enhanced insulin action in  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel-deficient mice. *Proc Natl Sci U S A* 95: 10402-10406

- Miki T, Nagashima K, Seino S (1999)  
The structure and function of the ATP-sensitive  $K^+$  channel in insulin-secreting pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol.* 22: 113-23
- Miki T, Minami K, Zhang L, Morita M, Gono T, Shiuchi T, Minokoshi Y, Renaud JM, Seino S (2002)  
ATP-sensitive potassium channels participate in glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283: E1178-84
- Mikhailov MV, Mikhailova EA, Ashcroft SJ (2002)  
Structure-function relationships in the beta-cell K(ATP) channel. *Biochem Soc Trans.* 30: 323-7
- Misler S, Barnett DW, Gillis KD, Pressel DM (1992)  
Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human beta-cells. *Diabetes.* 41: 1221-8
- Miura Y, Gilon P, Henquin JC (1996)  
Muscarinic stimulation increases  $Na^+$  entry in pancreatic B-cells by a mechanism other than the emptying of intracellular  $Ca^{2+}$  pools. *Biochem Biophys Res Commun.* 224: 67-73.
- Miura J, Henquin JC, Gilon P (1997)  
Emptying of intracellular  $Ca^{2+}$  stores stimulates  $Ca^{2+}$  entry in mouse pancreatic beta-cells by both direct and indirect mechanisms. *J Physiol* 503: 387-398
- Miyata H, Silverman HS, Sollott SJ, Lakatta EG, Stern MD, Hansford RG (1991)  
Measurement of mitochondrial free  $Ca^{2+}$  concentration in living single rat cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 261(4 Pt 2): H1123-34
- Molven A, Matre G, Duran M, Wanders R, Rishaug U, Njolstad P, Jellum E, Sovik O (2004)  
Familial hyperinsulinemic hypoglycemia caused by a defect in the SCHAD enzyme of mitochondrial fatty acid oxidation. *Diabetes* 53: 221-7
- Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001)  
Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense  $Ca^{2+}$ . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 3197-202
- Nagamatsu S, Fujiwara T, Nakamichi Y et al. (1996)  
Expression and functional role of syntaxin 1/HPC-1 in pancreatic  $\beta$  cells. *J Biol Chem* 271:1160-1165

- Nagamatsu S, Watanabe T, Nakamichi Y, Yamamura C, Tsuzuki K, Matsushima S (1999)  
 $\alpha$ -Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein is expressed in pancreatic  $\beta$  cells and functions in insulin but not  $\gamma$ -aminobutyric acid secretion. *J Biol Chem* 274:8053–8060
- Nakazaki M, Crane A, Hu M, Seghers V, Ullrich S, Aguilar-Bryan L, Bryan J (2002)  
cAMP-activated protein kinase-independent potentiation of insulin secretion by cAMP is impaired in SUR1 null islets. *Diabetes*. 51: 3440-9
- Nenquin M, Szollosi A, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Henquin JC (2004)  
Both triggering and amplifying pathways contribute to fuel-induced insulin secretion in the absence of sulfonylurea receptor-1 in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 279: 32316-24
- Nestorowicz A, Glaser B, Wilson BA, Shyng SL, Nichols CG, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA (1998)  
Genetic heterogeneity in familial hyperinsulinism. *Hum Mol Genet* 7:1119-1128
- Neye Y (2004)  
Die Bedeutung von  $K^+$ -Kanälen für die physiologische Funktion und pharmakologische Beeinflussung pankreatischer B-Zellen. *Dissertationsschrift*, Universität Tübingen
- Nichols CG, Shyng SL, Nestorowicz A, Glaser B, Clement JP 4th, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Permutt MA, Bryan J (1996)  
Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* 272: 1785-7
- Nilsson T, Arkhammar P, Rorsman P, Berggren PO (1988)  
Inhibition of glucose-stimulated insulin release by  $\alpha_2$ -adrenoceptor activation is paralleled by both a repolarization and a reduction in cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  concentration. *J Biol Chem* 263: 1855-1860
- Noma A (1983)  
ATP-regulated  $K^+$  channels in cardiac muscle. *Nature* 305: 147-148
- Oliver JR (1976)  
Inhibition of calcium uptake by somatostatin in isolated rat islets of Langerhans. *Endocrinology*. 99: 910-3.
- Ørskov C (1992)  
Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the entero-insular axis. *Diabetologia* 35: 701-711

- Ottschytch N, Raes A, Van Hoorick D, Snyders DJ (2002)  
Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 7986-91
- Owada S, Larsson O, Arkhammar P, Katz AI, Chibalin AV, Berggren PO, Bertorello AM (1999)  
Glucose decreases Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 274: 2000–2008
- Pace CS (1980)  
Somatostatin: control of stimulus-secretion coupling in pancreatic islet cells. *Soc Gen Physiol Ser* 35: 163-195
- Paolisso G, Scheen AJ, Giugliano D, Sgambato S, Albert A, Varricchio M, D'Onofrio F und Lefebvre PJ (1991)  
Pulsatile insulin delivery has greater metabolic effects than continuous hormone administration in man: importance of pulse frequency. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 607-615
- Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY (1991)  
Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*. 349: 305-10
- Parekh AB, Terlau H, Stühmer W (1993)  
Depletion of IP<sub>3</sub> stores activates a Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature* 364: 814-818.
- Pavenstädt H, Lindeman S, Lindeman V, Spath M, Kunzelmann K, Greger R (1991)  
Potassium conductance of smooth muscle cells from rabbit aorta in primary culture. *Pflügers Arch*. 419: 57-68.
- Plant TD (1988a)  
Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *J Physiol*. 404: 731-47
- Plant TD (1988b)  
Na<sup>+</sup> currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *Pflügers Arch–Eur J Physiol*. 411: 429-35
- Putney JW Jr (1986)  
A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7: 1-12.
- Putney JW Jr, Bird G (1993)  
The inositol phosphate calcium signaling system in nonexcitable cells. *Endocrine Reviews* 14: 610-631

- Prentki M, Matschinsky FM (1987)  
Ca<sup>2+</sup>, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev* 67: 1185-1248
- Quesada I, Soria B (2004)  
Intracellular location of K<sub>ATP</sub> channels and sulphonylurea receptors in the pancreatic beta-cell: new targets for oral antidiabetic agents. *Curr Med Chem*. 11: 2707-16.
- Rabinovitch A, Cerasi E, Sharp GW (1978)  
Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and -independent inhibitory effects of epinephrine on insulin release in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 102: 1733-1740
- Rizzuto R, Simpson AW, Brini M, Pozzan T (1992)  
Rapid changes of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*. 358: 325-7
- Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993)  
Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*. 262: 744-7
- Rizzuto R, Bastianutto C, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1994)  
Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis in intact cells. *J Cell Biol*. 126: 1183-94
- Robertson RP, Seaquist ER, Walseth TF (1991)  
G proteins and modulation of insulin secretion. *Diabetes* 40: 1-6
- Roe MW, Mertz RJ, Lancaster ME, Worley JF 3<sup>rd</sup>, Dukes ID (1994)  
Thapsigargin inhibits the glucose-induced decrease of intracellular Ca<sup>2+</sup> in mouse islets of Langerhans. *Am J Physiol* 266: E852-E862
- Roe MW, Worley JF 3<sup>rd</sup>, Mittal AA, Kuznetsov A, DasGupta S, Mertz RJ, Witherspoon SM 3<sup>rd</sup>, Blair N, Lancaster ME, McIntyre MS, Shehee WR, Dukes ID, Philipson LH (1996)  
Expression and function of pancreatic β-cell delayed rectifier K<sup>+</sup> channels. Role in stimulus-secretion coupling. *J Biol Chem* 271: 32241-32246
- Roe TF, Kogut MD (1982)  
Idiopathic leucine-sensitive hypoglycemia syndrome: insulin and glucagon responses and effects of diazoxide. *Pediatr Res* 16: 1-4
- Rolland JF, Henquin JC, Gilon P (2002)  
Feedback control of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> current by cytosolic Ca<sup>2+</sup> contributes to oscillations of the membrane potential in pancreatic β-cells. *Diabetes* 51: 376-384

- Rorsman P, Trube G (1985)  
Glucose-dependent  $K^+$ -channels in pancreatic  $\beta$ -cells are regulated by intracellular ATP. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 405: 305-309
- Rorsman P, Trube G (1986)  
Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic beta-cells under voltage-clamp conditions. *J Physiol*. 374: 531-50
- Rorsman P, Bokvist K, Ämmälä C, Arkhammar P, Berggren PO, Larsson O, Wahlander K (1991)  
Activation by adrenaline of a low-conductance G protein-dependent  $K^+$  channel in mouse pancreatic B cells. *Nature* 349: 77-79
- Rosario LM, Barbosa RM, Antunes CM, Silva AM, Abrunhosa AJ, Santos RM (1993)  
Bursting electrical activity in pancreatic  $\beta$ -cells: evidence that the channel underlying the burst is sensitive to  $Ca^{2+}$  influx through L-type  $Ca^{2+}$  channels. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 424: 439-447
- Rutter GA, Theler JM, Murgia M, Wollheim CB, Pozzan T, Rizzuto R (1993)  
Stimulated  $Ca^{2+}$  influx raises mitochondrial free  $Ca^{2+}$  to supramicromolar levels in a pancreatic beta-cell line. Possible role in glucose and agonist-induced insulin secretion. *J Biol Chem*. 268: 22385-90
- Sadoul K, Lang J, Montecucco C et al. (1995)  
SNAP-25 is expressed in islets of Langerhans and is involved in insulin release. *J Cell Biol* 128:1019–1028
- Safayhi H, Haase H, Kramer U, Bihlmayer A, Roenfeldt M, Ammon HP, Froschmayr M, Cassidy TN, Morano I, Ahlijanian MK, Striessnig J (1997)  
L-type calcium channels in insulin-secreting cells: biochemical characterization and phosphorylation in RINm5F cells. *Mol Endocrinol* 11: 619-629
- Sakura H, Ämmälä C, Smith PA, Gribble FM, Ashcroft FM (1995)  
Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic  $\beta$ -cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* 377: 338-344
- Sanger F, Thompson EO, Kitai R (1955)  
The amide groups of insulin. *Biochem J* 59: 509-18
- Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M (1991)  
Widespread synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 418: 417-422
- Satin LS, Cook DL (1985)  
Voltage-gated  $Ca^{2+}$  current in pancreatic B-cells. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 404: 385-387

- Satin LS, Cook DL (1988)  
Evidence for two calcium currents in insulin-secreting cells. *Pflügers Arch.* 411: 401-9
- Satin LS, Cook DL (1989)  
Calcium current inactivation in insulin-secreting cells is mediated by calcium influx and membrane depolarization. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 414: 1-10
- Sato Y, Aizawa T, Komatsu M, Okada N, Yamada T (1992)  
Dual functional role of membrane depolarization/ $\text{Ca}^{2+}$  influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes* 41: 438-443
- Sato Y, Anello M, Henquin JC (1999)  
Glucose regulation of insulin secretion independent of the opening or closure of adenosine triphosphate-sensitive  $\text{K}^+$  channels in  $\beta$  cells. *Endocrinology* 140: 2252-2257
- Schuit FC, Pipeleers DG (1985)  
Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate levels in the pancreatic B cell. *Endocrinology* 117: 834-840
- Schulla V, Renström E, Feil R, Feil S, Franklin I, Gjinovci A, Jing XJ, Laux D, Lundquist I, Magnuson MA, Obermüller S, Olofsson CS, Salehi A, Wendt A, Klugbauer N, Wollheim CB, Rorsman P, Hofmann F (2003)  
Impaired insulin secretion and glucose tolerance in beta cell-selective  $\text{Ca}_v1.2$   $\text{Ca}^{2+}$  channel null mice. *EMBO J.* 22: 3844-54
- Scrocchi LA, Brown TJ, McClusky N, Brubaker PL, Auerbach AB, Joyner AL, Drucker DJ (1996)  
Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med* 2: 1254-8
- Segal KR, Landt M, Klein S (1996)  
Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes.* 45: 988-91.
- Seghers V, Nakazaki M, DeMayo F, Aguilar-Bryan L, Bryan J (2000)  
Sur1 knockout mice. A model for  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel-independent regulation of insulin secretion. *J Biol Chem* 275: 9270-9277
- Seidler NW, Jona I, Vegh M, Martonosi A (1989)  
Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264:17816-23

- Sekine N, Cirulli V, Regazzi R, Brown LJ, Gine E, Tamarit-Rodriguez J, Girotti M, Marie S, MacDonald MJ, Wollheim CB, Rutter GA (1994)  
Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem.* 269: 4895-902
- Sener A, Kawazu S, Hutton JC, Boschero AC, Devis G, Somers G, Herchuelz A, Malaisse WJ (1978)  
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Effect of exogenous pyruvate on islet function. *Biochem J* 176: 217-232
- Shanbag P, Pathak A, Vaidya M, Shahid SK (2002)  
Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy--successful therapy with nifedipine. *Indian J Pediatr.* 69: 271-2
- Shiota C, Larsson O, Shelton KD, Shiota M, Efanov AM, Hoy M, Lindner J, Kooptiwut S, Juntti-Berggren L, Gromada J, Berggren PO, Magnuson MA (2002)  
Sulfonylurea receptor type 1 knock-out mice have intact feeding-stimulated insulin secretion despite marked impairment in their response to glucose. *J Biol Chem* 277: 37176-37183
- Shyng S, Ferrigni T, Nichols CG (1997)  
Regulation of K<sub>ATP</sub> channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *J Gen Physiol.* 110: 643-54
- Sieg A, Su J, Munoz A, Buchenau M, Nakazaki M, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Ullrich S (2004)  
Epinephrine-induced hyperpolarization of islet cells without K<sub>ATP</sub> channels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E463-E471
- Siegel EG, Wollheim CB, Renold AE, Sharp GWG (1980)  
Evidence for the involvement of Na/Ca exchange in glucose-induced insulin release from rat pancreatic islets. *J Clin Invest* 66: 996-1003
- Simpson PB, Russell JT (1996)  
Mitochondria support inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca<sup>2+</sup> waves in cultured oligodendrocytes. *J. Biol. Chem.* 271: 33493-33501
- Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N (1991)  
The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science.* 253: 1553-7
- Smith PA, Ashcroft FM, Rorsman P (1990a)  
Simultaneous recordings of glucose dependent electrical activity and ATP-regulated K<sup>+</sup>-current in isolated mouse pancreatic β-cells. *FEBS Lett* 261: 187-190

- Smith PA, Bokvist K, Arkhammar P, Berggren PO, Rorsman P (1990b)  
Delayed rectifying and calcium-activated  $K^+$  channels and their significance for action potential repolarization in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *J Gen Physiol* 95: 1041-1059
- Smith PA, Quayle J (1993)  
Two types of Ca-channels in human pancreatic b-cells. *J Physiol* 459: 238P
- Stanley CA, Baker L (1976)  
Hyperinsulinism in infants and children: diagnosis and therapy. *Advances in Pediatrics* 23: 315-355.
- Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, Zammarchi E, Poncz M (1998)  
Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med* 338: 1352-7
- Steiner DF, Chan SJ, Welsh JM, Kwok SC (1985)  
Structure and evolution of the insulin gene. *Annu Rev Genet.* 19: 463-84
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA (2001)  
The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 409: 307-12.
- Su J, Yu H, Lenka N, Hescheler J, Ullrich S (2001)  
The expression and regulation of depolarization-activated  $K^+$  channels in the insulin-secreting cell line INS-1. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 442: 49-56
- Sun X, Cao K, Yang G, Huang Y, Hanna ST, Wang R (2004)  
Selective expression of Kir6.1 protein in different vascular and non-vascular tissues. *Biochem Pharmacol* 67: 147-156
- Tabcharani JA, Misler S (1989)  
 $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel in rat pancreatic islet B cells: permeation, gating and blockade by cations. *Biochim Biophys Acta* 982: 62-72
- Takahashi E, Miyamoto N, Nagasu T (2000)  
Analysis of the 5'-upstream region of mouse P/Q-type  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha 1A$  subunit gene for expression in pancreatic islet beta cells using transgenic mice and HIT-T15 cells. *J Mol Endocrinol.* 24: 225-32
- Tamarina NA, Wang Y, Mariotto L, Kuznetsov A, Bond C, Adelman J, Philipson LH (2003)  
Small-conductance calcium-activated  $K^+$  channels are expressed in pancreatic islets and regulate glucose responses. *Diabetes* 52: 2000-2006

- Tareilus E, Roux M, Qin N, Olcese R, Zhou J, Stefani E, Birnbaumer L (1997)  
A *Xenopus* oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 1703-8
- Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson, AP (1990)  
Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $Ca^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 2466-2470
- Therien AG, Blostein R (2000)  
Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279: C541-566
- Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF (1988)  
Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and  $\beta$ -pancreatic islet cells. *Cell* 55: 281-290
- Thorens B, Waeber G (1993)  
Glucagon-like peptide-I and the control of insulin secretion in the normal state and in NIDDM. *Diabetes* 42: 1219-1225
- Tornheim K (1997)  
Are metabolic oscillations responsible for normal oscillatory insulin secretion? *Diabetes* 46: 1375-80
- Tornovsky S, Crane A, Cosgrove KE, Hussain K, Lavie J, Heyman M, Nesher Y, Kuchinski N, Ben-Shushan E, Shatz O, Nahari E, Potikha T, Zangen D, Tenenbaum-Rakover Y, de Vries L, Argente J, Gracia R, Landau H, Eliakim A, Lindley K, Dunne MJ, Aguilar-Bryan L, Glaser B (2004)  
Hyperinsulinism of infancy: novel ABCC8 and KCNJ11 mutations and evidence for additional locus heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 6224-34.
- Trapp S, Tucker SJ, Ashcroft FM (1998)  
Mechanism of ATP-sensitive K channel inhibition by sulfhydryl modification. *J Gen Physiol* 112: 325-332
- Triner L, Killian P, Nahas GG (1968)  
Ouabain hypoglycemia: insulin mediation. *Science* 162: 560-561
- Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S und Ashcroft FM (1997)  
Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive  $K^+$  channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* 387: 179-183
- Tusnady GE, Bakos E, Varadi A, Sarkadi B (1997)  
Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett.* 402: 1-3.

- Ueda K, Komine J, Matsuo M, Seino S, Amachi T (1999)  
Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 1268-72.
- Ullrich S, Wollheim CB (1988)  
GTP-dependent inhibition of insulin secretion by epinephrine in permeabilized RINm5F cells. Lack of correlation between insulin secretion and cyclic AMP levels. *J Biol Chem* 263: 8615-8620
- Ullrich S, Wollheim CB(1989)  
Galanin inhibits insulin secretion by direct interference with exocytosis. *FEBS Let* 247: 401-404
- Van Bever L, Poitry S, Faure C, Norman RI, Roatti A, Baertschi AJ (2004)  
Pore loop-mutated rat KIR6.1 and KIR6.2 suppress  $K_{ATP}$  current in rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287: H850-9
- Varadi A, Rutter GA (2002)  
Dynamic imaging of endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  concentration in insulin-secreting MIN6 cells using recombinant targeted Cameleons. Roles of sarco(endo)plasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA)-2 and ryanodine receptors. *Diabetes* 51, Suppl. 4, S190–S201
- Vasington FD, Murphy JV (1962)  
Calcium ion uptake by fragments of rat liver mitochondria and its dependence on electron transport. *J Biol Chem* 237: 2670-2677
- Verkarre V, Fournet JC, de Lonlay P, Gross-Morand MS, Devillers M, Rahier J, Brunelle F, Robert JJ, Nihoul-Fekete C, Saudubray JM, Junien C (1998)  
Paternal mutation of the sulfonylurea receptor (SUR1) gene and maternal loss of 11p15 imprinted genes lead to persistent hyperinsulinism in focal adenomatous hyperplasia. *J Clin Invest.* 102: 1286-91
- Verspohl EJ und Herrmann K (1996)  
Involvement of G proteins in the effect of carbachol and cholecystokinin in rat pancreatic islets. *Am J Physiol* 271: E65-E72
- Wahl MA (1994)  
Zellulärer Mechanismus der Peptid-modulierten Insulinsekretion. *Habilitationsschrift*, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982)  
Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-51

- Wendt-Gallitelli MF, Isenberg G (1991)  
Total and free myoplasmic calcium during a contraction cycle: x-ray microanalysis in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol.* 435: 349-72
- Wheeler MB, Sheu L, Ghai M et al. (1996)  
Characterization of SNARE protein expression in  $\beta$  cell lines and pancreatic islets. *Endocrinology* 137:1340–1348
- Wollheim CB, Siegel EG, Sharp GW (1980)  
Dependency of acetylcholine-induced insulin release on  $\text{Ca}^{++}$  uptake by rat pancreatic islets. *Endocrinology.* 107: 924-9
- Wollheim CB, Sharp GW (1981)  
Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev* 61: 914-973
- Worley JF III, McIntyre MS, Spencer B, Dukes ID (1994a)  
Depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores activates a maitotoxin-sensitive nonselective cationic current in  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* 269: 32055-32058.
- Worley JF III, McIntyre MS, Spencer B, Mertz RJ, Roe MW, Dukes ID (1994b)  
Endoplasmic reticulum calcium store regulates membrane potential in mouse islet  $\beta$ -cells. *J Biol Chem* 269: 14359-14362
- Yada T, Kakei M, Tanaka H (1992)  
Single pancreatic  $\beta$ -cells from normal rats exhibit an initial decrease and subsequent increase in cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in response to glucose. *Cell Calcium* 13: 69-76
- Yan L, Figueroa DJ, Austin CP, Liu Y, Bugianesi RM, Slaughter RS, Kaczorowski GJ, Kohler MG (2004)  
Expression of voltage-gated potassium channels in human and rhesus pancreatic islets. *Diabetes* 53: 597-607
- Yang SN, Larsson O, Bränström R, Bertorello AM, Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kohler M, Meister B, Berggren PO (1999)  
Syntaxin 1 interacts with the L(D) subtype of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 10164-9
- Yang SN, Berggren PO (2005)  
 $\text{Ca}_v2.3$  channel and PKC  $\lambda$ : new players in insulin secretion. *J Clin Invest.* 115: 16-20
- Zawalich WS, Diaz VA, Zawalich KC (1987)  
Cholecystokinin-induced alterations in  $\beta$ -cell sensitivity. Duration, specificity, and involvement of phosphoinositide metabolism. *Diabetes* 36: 1420-1424

Zawalich WS, Rasmussen H (1990)

Control of insulin secretion: a model involving  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP and diacylglycerol.  
*Mol Cell Endocrinol* 70: 119-137

Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY (1999)

A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels. *Neuron* 22: 537-548

## 9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2002 bis Dezember 2005 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. G. Drews am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Frau Prof. Dr. G. Drews danke ich besonders für die Überlassung des spannenden Themas und die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit. Sie hat es stets verstanden mich zu motivieren und herauszufordern. Dadurch hat sie mein Interesse an wissenschaftlichen Fragestellungen geprägt und auch meine persönliche Entwicklung entschieden vorangetrieben.

Herrn Prof. Dr. P. Krippel-Drews danke ich für seine netten aufmunternden Worte besonders in Krisenzeiten mit der Mikroelektrode. Darüber hinaus hat er mein Verständnis für die Physiologie und insbesondere die Elektrophysiologie enorm erweitert. Aber auch für manche privaten Gespräche neben den wissenschaftlichen Disputen danke ich ihm.

Herrn Prof. Dr. P. Ruth danke ich für die sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit und die wissenschaftliche Unterstützung, insbesondere für seine Hilfe bei allen molekularbiologischen Fragestellungen.

Frau Dr. Martina Düfer danke ich sehr für ihre ständige Gesprächsbereitschaft weit über die wissenschaftlichen Belange hinaus. Sie hat meine Arbeit stets kritisch hinterfragt und die Qualität dadurch entschieden verbessert.

Yvonne danke ich für zwei schöne gemeinsame Jahre des Arbeitens und der daraus entstandenen Freundschaft.

Micha Bäcker danke ich für alles was ich über Netzwerkadministration von ihm gelernt habe und für so manch tiefsinnige und manch unsinnige Gespräche.

Isolde Breuning danke ich sehr herzlich für ihre hervorragenden Insulinsekretionsmessungen, geteilte Liebe zu Neil Young und ihre Aufmunterungen in schlechten Zeiten.

---

Ein besonderer Dank geht an Antje, Christina, Clement, Daniela, Doro, Franz, Hong, Iancu, Jasmin, Mandy, Matthias, Micha Retlich, Tina, Timm, Ulrike, Usamah und Yiliu für die gute Zusammenarbeit und nette Atmosphäre.

Claus und Golo danke ich im Besonderen für ihren unermüdlichen Einsatz mich in die Geheimnisse des Klonierens und der Molekularbiologie einzuweihen.

Herrn Bröckel und Frau Kössler danke ich für die sorgfältige Pflege der Tiere.

Bei Frau Strohmaier möchte ich mich für ihre Hilfe und für ihre Freundlichkeit bedanken.

Tobias Rohm danke ich für seine Freundschaft und die Hilfe beim Druck der Arbeit.

Dr. Friedhelm und Karin Schönwald danke ich für ihre finanzielle Unterstützung ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Eltern danke ich sehr herzlich, dass sie schon sehr früh meinen Forscherdrang gefördert und mir mein Studium ermöglicht haben. Sie haben stets mein Promotionsvorhaben unterstützt und mich auch in schwierigen Zeiten immer wieder ermutigt.

Ein besonderer Dank geht an meine liebe Frau Silke, die immer an meiner Seite durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit mit mir gegangen ist und auf manches verzichtet hat um diese Arbeit zu ermöglichen.

Meine akademischen Lehrer waren neben Frau Prof. Dr. G. Drews und Herrn Prof. Dr. P. Krippeit-Drews:

R. Csuk, U. Hilgenfeldt, M. Wink, J. Reichling, R. Neidlein, G. Fricker, H. Ludwig, T. Lindel, R. Faust, H.P. Deigner, D. Krüger, M. Steinhausen

# Dirk Haspel

14.12.1974

Bietigheim-Bissingen

deutsch

verheiratet

## Schulausbildung

09/1981 - 07/1985 Hillerschule in Bietigheim-Bissingen  
09/1985 - 06/1994 Gymnasium in Bietigheim-Bissingen, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Studium und beruflicher Werdegang

10/95 – 03/96 Studium der Technischen Biologie in Stuttgart  
04/96 – 05/01 Studium der Pharmazie  
03/97 Famulatur in der Zentralapotheke der Kliniken gGmbH in Ludwigsburg  
09/97 Famulatur in der Rosen-Apotheke in Bietigheim  
03/1999 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
05/2001 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
06/2001 - 12/2001 Praktisches Jahr in der Stern-Apotheke in Weinheim  
12/2001 - 06/2002 Praktisches Jahr bei der ROCHE Diagnostics AG in Mannheim  
07/2002 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
08/2002 Approbation als Apotheker  
09/2002 – 09/2005 Arbeiten zur vorliegenden Dissertation bei Frau Prof. Dr. G. Drews am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen, Pharmakologie für Naturwissenschaftler zum Thema: „Stimulus-Sekretions-Kopplung in pankreatischen B-Zellen aus SUR1<sup>-/-</sup>-Mäusen“  
09/2002 - 12/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Frau Prof. Dr. G. Drews am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen, Pharmakologie für Naturwissenschaftler