

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON  
GLP-1 REZEPTORAGONISTEN AUF DIE  
BETAZELL-APOPTOSE

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Daniel Tews, geb. Knierim  
aus Hagen (Westf.)  
April 2008

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie  
des Deutschen Diabetes-Zentrums, Leibniz-Institut an der Heinrich-  
Heine-Universität, Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Jürgen Eckel  
Koreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich  
Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2008

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Sie wurde in dieser oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionversuche unternommen.

Düsseldorf, den 24. Juni 2008

Daniel Tews

*„Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge sind, wie sie sind.“*

Aristoteles

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Diabetes mellitus . . . . .	1
1.1.1	Die verschiedenen Arten des Diabetes mellitus	1
1.1.2	Epidemiologie des Diabetes mellitus . . . . .	5
1.2	Apoptose . . . . .	6
1.2.1	Molekulare Mechanismen der Apoptose . . . . .	7
1.2.2	Rolle der Betazell-Apoptose beim Diabetes . . . . .	17
1.3	Glucagon-like peptide 1 . . . . .	22
1.3.1	Der Inkretineffekt . . . . .	23
1.3.2	Synthese, Sekretion und Degradation . . . . .	24
1.3.3	Glp-1 Mimetika . . . . .	25
1.3.4	Der Glp-1 Rezeptor . . . . .	27
1.3.5	Wirkung von Glp-1 auf die Betazelle . . . . .	27
1.3.6	Die antiapoptotische Wirkung von Glp-1 . . . . .	28
1.4	Ziel der Arbeit . . . . .	30
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>31</b>
2.1	Materialien . . . . .	31
2.1.1	Chemikalien . . . . .	31
2.1.2	Fertigprodukte . . . . .	33
2.1.3	Kit-Systeme . . . . .	33
2.1.4	Antikörper . . . . .	33
2.1.5	Puffer . . . . .	34
2.1.6	Zellkulturmedien . . . . .	37
2.1.7	Geräte . . . . .	38
2.2	Zellbiologische Methoden . . . . .	39
2.2.1	Kultivierung von INS-1 Betazellen . . . . .	39
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl . . . . .	39
2.2.3	Induktion von Apoptose durch Zytokine . . . . .	40
2.2.4	Induktion von Apoptose durch Fettsäuren . . . . .	40

2.2.5	Induktion von Apoptose durch hohe Glukose- spiegel . . . . .	40
2.2.6	Isolierung funktioneller Mitochondrien aus INS- 1 Zellen . . . . .	41
2.2.7	Transfektion von siRNA . . . . .	42
2.2.8	Herstellung von Gesamtzellysaten . . . . .	43
2.2.9	Messung von intrazellulären cAMP-Spiegeln . .	43
2.2.10	Messung von Insulinsekretion . . . . .	44
2.2.11	Detektion von Apoptose . . . . .	44
2.2.12	Messung reaktiver Sauerstoffspezies . . . . .	46
2.3	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	46
2.3.1	Enzymaktivitätsmessungen . . . . .	46
2.3.2	Proteinbestimmung . . . . .	50
2.3.3	Eindimensionale gelelektrophoretische Protein- auftrennung . . . . .	50
2.3.4	Proteintransfer auf Membranen . . . . .	51
2.3.5	Immundetektion . . . . .	51
2.3.6	Zweidimensionale differentielle Gelelektropho- rese (2D-DIGE) . . . . .	52
2.3.7	Bildanalyse . . . . .	53
2.3.8	Identifikation von Proteinen mittels MALDI-MS	54
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
3.1	Stimulation der Glukose-induzierten Insulinsekretion	56
3.2	Induktion von Apoptose durch verschiedene Stimuli .	56
3.2.1	Induktion durch Zytokine . . . . .	57
3.2.2	Induktion durch hohe Glukosespiegel . . . . .	59
3.2.3	Induktion durch freie Fettsäuren . . . . .	60
3.3	Präparation funktioneller Mitochondrien . . . . .	60
3.4	Vergleichende, quantitative Analyse verschiedener mit- ochondrialer Proteinmuster durch 2D-DIGE . . . . .	62
3.5	Identifikation der unterschiedlich exprimierten Prote- inspots . . . . .	63
3.6	Regulation von Grp78/BiP durch Glp-1RA . . . . .	70

3.7 Inhibition von oxidativem Stress durch Glp-1RA . . . .	72
3.8 Auswirkungen von Glp-1RA auf die Aktivierung der Adenylatcyclase . . . . .	72
3.9 Auswirkungen von Glp-1RA auf die Aktivierung der Akt	74
3.10 Transiente Genrepression der Akt . . . . .	75
3.11 Caspase 3-Aktivität nach Repression der Akt . . . . .	79
3.12 Kombination von Glp-1RA und Insulinanaloga . . . . .	79
3.12.1 Inhibition zytokin-induzierter Apoptose . . . . .	80
3.12.2 Inhibition fettsäureinduzierter Apoptose . . . . .	81
<b>4 Diskussion</b>	<b>84</b>
4.1 Zum verwendeten Zellmodell . . . . .	84
4.2 Die antiapoptotische Wirkung von Glp-1 Rezeptorago- nisten . . . . .	85
4.3 Analyse mitochondrialer Proteinmuster nach Exendin- 4-Behandlung unter Apoptose . . . . .	89
4.4 Signaltransduktion von Glp-1 . . . . .	94
4.5 Verstärkte anti-apoptotische Wirkung von Insulinana- loga durch Glp-1 Mimetika . . . . .	96
<b>5 Zusammenfassung / Summary</b>	<b>99</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>140</b>
7.1 Abkürzungen . . . . .	140
7.2 Abbildungsverzeichnis . . . . .	142
7.3 Tabellenverzeichnis . . . . .	144
<b>8 Danke!</b>	<b>145</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist die am häufigsten auftretende Stoffwechselkrankheit, wobei ein erhöhter Blutzuckerspiegel das Hauptmerkmal darstellt. Es gibt allerdings unterschiedliche Pathomechanismen als Ursache dieser Hyperglykämie. Bereits in der Antike findet Diabetes mellitus erstmals Erwähnung und wird dort wegen des süßen Urins Betroffener als „honigsüßer Durchfluß“ beschrieben (von altgriechisch *διαβαίνειν* „hindurchfließen“ und lateinisch *mellitus* „honigsüß“).

Wird Glukose vom Körper nicht mehr ausreichend metabolisiert, kommt es zum Anstieg der basalen und postprandialen Glukosespiegel, die mitunter Werte von 40 mM erreichen. Um diese hohen Konzentrationen auszugleichen, wird vermehrt Glukose über die Nieren ausgeschieden (Glukosurie), was zu einem deutlich erhöhten Harndrang führt. Die Folge sind ein starkes Durstgefühl durch den verstärkten Wasserbedarf und ein allgemeiner Leistungsabfall, da die Körperzellen nicht mehr ausreichend mit Nahrungsenergie versorgt werden.

Als Ausgleich wird vermehrt Glykogen und später Depotfett abgebaut. Dies hat eine vermehrte Bildung von Ketonkörpern zu Folge, welche in der Atemluft von Patienten als typischer Ketongeruch wahrgenommen werden können. Darüber hinaus führt die Bildung von Ketonkörpern zu einer Übersäuerung des Blutes (Ketoazidose).

### 1.1.1 Die verschiedenen Arten des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus wird je nach seiner Pathogenese im allgemeinen in zwei Formen unterteilt. Beim Typ-1-Diabetes kommt es zu einem absoluten Mangel an Insulin (IDDM *insulin-dependent diabetes mellitus*), beim Typ-2-Diabetes ist dagegen die Signalwirkung



von Insulin in seinen Zielorganen gestört (NIDDM *non-insulin-dependent diabetes mellitus*) [1].

### **Typ-1-Diabetes**

Bei dieser Autoimmunerkrankung richtet sich das Immunsystem gegen die körpereigenen insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas. Ihre daraus resultierende Zerstörung führt sukzessive zu einem Insulinmangel. Diese Form des Diabetes entwickelt sich bereits im Kindesalter, weshalb man auch von juvenilem oder Jugenddiabetes spricht. Bei 80 bis 90-prozentiger Zerstörung der Betazellen manifestiert sich der Typ-1-Diabetes, welcher die Gabe von exogenem Insulin notwendig macht.

Als Ursachen werden verschiedene Faktoren diskutiert. Dazu gehören genetische Defekte, Viruserkrankungen durch z.B. Röteln-, Ruboxi- oder Herpesviren sowie umweltbedingte Faktoren. Auch die frühe Exposition gegen Milchprotein oder Gluten werden als auslösende Faktoren genannt. Symptomatisch für Typ-1-Diabetes sind eine ausgeprägte Gewichtsabnahme verbunden mit Austrocknung (Exikose), ständigem Durstgefühl, häufigem Wasserlassen, Erbrechen und gelegentlich auch Wadenkrämpfen und Bauchschmerzen. Etwa 5 % aller Diabetiker sind Typ-1-Diabetiker.

### **Typ-2-Diabetes**

Im Gegensatz dazu liegt dieser Form des Diabetes eine Insulinresistenz der peripheren Glukose-verwendenden Gewebe (Skelettmuskulatur, Leber, Fettgewebe) vor. Dies führt zunächst zu einer verstärkten Insulinproduktion in den Betazellen des Pankreas. Mit fortschreitender Erkrankung kann diese erhöhte Sekretion allerdings nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zum Betazellversagen und dem Absterben der Betazellen.

Oft geht diese Form des Diabetes einher mit weiteren Komplikationen des Stoffwechsels, die in ihrer Gesamtheit als das Metabolische Syndrom bezeichnet werden. Dazu gehören ein verstärktes

Übergewicht (Adipositas), Insulinresistenz [2], Hyperinsulinämie, Hypertonie [3, 4], Hypertriglyzeridämie [5, 6] und Hyperlipidämie [7, 8]. Die Weltgesundheitsorganisation WHO definiert das metabolische Syndrom als Diabetes, Insulinresistenz, Glukoseintoleranz bzw. gesteigerte basale Glukosespiegel gepaart mit mindestens zwei der folgenden Kriterien (WHO 1999):

- ein Taille/Hüft-Verhältnis von mehr als 0,9 (Männer) bzw. 0,85 (Frauen)
- Triglycerid-Konzentrationen im Serum größer als 1,7 mM bzw. HDL-Konzentrationen unter 0,9 mM (Männer) bzw. 1,0 mM (Frauen)
- Blutdruck über 140/90 mm Hg
- Ausscheidungsrate von Albumin größer als 20  $\mu\text{g}/\text{min}$  oder ein Albumin/Creatinin-Verhältnis über 30 mg/g

Hauptursache eines metabolischen Syndroms ist die Entwicklung einer Insulinresistenz. Neben genetischer Prädisposition kann diese durch Übergewicht und Bewegungsmangel, aber auch durch Medikamente hervorgerufen werden. Durch die daraus resultierende anhaltende Hyperglykämie kommt es zusätzlich zu einer Insulinsekretionsstörung, die im weiteren Verlauf in einen Ausfall der Insulinsekretion mündet. Die Frage, inwiefern eine chronische Hyperglykämie zu einem Sekretionsdefekt führt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Prinzipiell können sich Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung gegenseitig bedingen. Einige Studien weisen jedoch darauf hin, dass die Insulinresistenz eine Sekretionsstörung nach sich zieht [9]. Allerdings könnten für die Sekretionsstörung auch genetische Defekte eine Rolle spielen. Weiterhin verstärken hohe Glukosespiegel die Insulinsekretionsstörung direkt auf Ebene der Betazelle (Glukotoxizität, siehe 1.2.2) [10] und verursachen letztendlich eine Zerstörung der Betazellen.

Freie Fettsäuren sind ein entscheidender Faktor für die Entwicklung der Insulinresistenz. Sie können aus dem intraabdominellen Fettgewebe durch Lipolyse kurzfristig in die Blutbahn freigesetzt werden. Normalerweise wirkt Insulin diesem Prozess entgegen [11]. Bei insulinresistenten Personen geht der hemmende Effekt auf die Lipase jedoch bereits frühzeitig verloren, so dass vermehrt freie Fettsäuren in die Blutbahn gelangen. Aus diesem Grund gehört die Hypertriglyzeridämie zu den sehr früh und häufig nachweisbaren Folgen der Insulinresistenz. Zusätzlich bewirken hohe Spiegel von freien Fettsäuren eine weitere Schädigung der pankreatischen Betazellen (Lipotoxizität, siehe 1.2.2) [12].

Diabetes mellitus erhöht zudem die Wahrscheinlichkeit, an einer Reihe von Folgeschäden zu erkranken. Dazu gehören kardiovaskuläre Schäden wie Bluthochdruck und Mikro- und Makroangiopathien sowie Schädigungen der peripheren Nerven. Etwa 90 % aller Diabetiker sind Typ-2-Diabetiker.

### **Weitere spezifische Formen**

Der MODY-Diabetes (*maturity onset diabetes of the young*) ist eine spezifische Form des Diabetes, die im Kinder- und Jugendalter auftritt. Ausgelöst wird dieser durch Gendefekte des Glukosestoffwechsels auf Ebene der Betazelle. Nur selten finden sich hier Autoantikörper gegen Betazell-Gene. Auch sind die Patienten weder insulinpflichtig noch übergewichtig. Bekannt sind bisher sechs Typen, beruhend auf Mutationen des Gens des *hepatic nuclear factor* (HNF) [13, 14, 15, 16, 17] bzw. der Glukokinase [18].

Aufgrund des veränderten Hormonhaushaltes kann bei Schwangerschaft ein sogenannter Gestationsdiabetes entstehen. Dieser ist allerdings meist temporär begrenzt, der Stoffwechsel normalisiert sich nach der Schwangerschaft wieder. Übergewicht, ein Alter über 30 Jahre und eine familiäre Vorbelastung gelten als Hauptursache eines Gestationsdiabetes.

Eher ungewöhnliche Formen des Diabetes sind auf Gendefekte in

der Insulinwirkung, endokrine Störungen, Infektionen des Pankreas, Pankreaskarzinome oder Schädigungen durch Medikamente zurückzuführen.

### **1.1.2 Epidemiologie des Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus gehört zu den häufigsten und für die Gesundheitssysteme kostspieligsten Stoffwechselkrankheiten weltweit. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt den Gesamtanteil an Diabetikern an der Weltbevölkerung auf 180 Millionen. Die aktuellen Prognosen sagen eine Verdopplung der Diabetesprävalenz für das Jahr 2030 voraus. Etwa 1,1 Millionen Menschen sterben jedes Jahr an den Folgen des Diabetes mellitus, wobei die Dunkelziffer als höher angesehen werden muss (Daten WHO, Stand 2006). 80 % aller auf Diabetes zurückzuführenden Todesfälle ereignen sich in Entwicklungs- bzw. Schwellenländern.

In Europa litten 2003 48,4 Millionen Menschen an Diabetes, davon 6,3 Millionen in der Bundesrepublik. Schätzungen der International Diabetes Foundation (IDF) zufolge erreicht die Diabetesprävalenz in Deutschland 2025 einen Stand von 11,9 % (Diabetes Atlas 2. Ausgabe 2003, IDF). Die höchsten Diabetesprävalenzen finden sich in Nauru (30,2 %), in den Vereinigten Arabischen Emiraten (20,1 %), in Katar (16 %), Bahrain (14,9 %) und Kuba (13,2 %).

Diabetes mellitus und seine Folgekrankheiten stellen auch ein erhebliches finanzielles Problem für die Gesundheitssysteme dar. Schätzungen zufolge wird 2025 der Anteil am weltweiten Gesundheitsbudget 7-10 % betragen. Nach Auswertung der CoDiM (*Costs of Diabetes Mellitus*)-Studie beliefen sich die direkten Kosten für diabetische Patienten im Jahr 2001 in der Bundesrepublik Deutschland auf 30,6 Milliarden Euro. Dies entspricht einem Anteil von 14,2 Prozent an den nationalen Gesundheitsausgaben [19].

## 1.2 Apoptose

Im späten Stadium des Diabetes kommt es zum Untergang der Betazellen durch eine Reihe toxischer Faktoren (1.2.2). Dieser Zelltod kann durch zwei unterschiedlich Mechanismen hervorgerufen werden: Nekrose und Apoptose.

Nekrose ist das Ergebnis einer akuten zellulären Dysfunktion als Antwort auf schwere Stresseinwirkungen oder toxische Substanzen. Es ist ein passiver Prozess, bei dem keine Energieaufwendung in Form von ATP notwendig ist. Morphologisch ist Nekrose durch eine dramatische Zellvergrößerung und Auflösung der äußeren Zellmembran gekennzeichnet, wodurch der Zellinhalt unkontrolliert in den interzellulären Raum gelangt [20]. Dieser Ausfluss von Zellinhalten der sterbenden Zellen kann darüber hinaus weitere Gewebe durch die Attraktion von Immunzellen oder durch direkte Beeinflussung benachbarter Zellen schädigen [21].

Im Gegensatz dazu ist Apoptose ein aktiver Prozess in mehrzelligen Organismen um überflüssige, infizierte oder beschädigte Zellen zu entfernen [22]. Dieses genetische Programm ist essentiell für eine normale Entwicklung, die Gewebshomöostase und für ein funktionierendes Immunsystem. Es ist daher nicht überraschend, dass Defekte in der Apoptose zu degenerativen Krankheiten, Autoimmunkrankheiten und Krebs führen können [23, 24]. Apoptose ist gekennzeichnet durch eine Reihe biochemischer und morphologischer Prozesse, die das Zytoplasma, die Zellmembran und den Zellkern betreffen. Im frühen Stadium der Apoptose schrumpfen die Zellen, verlieren dadurch den Kontakt zu ihren Nachbarzellen und runden sich ab. Dabei verliert die Zellmembran auch ihre typische heterogene Phospholipidstruktur [25]. Im Zellkern kondensiert das Chromatin und wird von Endonukleasen internucleosomal in Fragmente gleicher Größe gespalten. Im fortgeschrittenen Stadium der Apoptose zerfällt der Kern, die Zelle bricht schließlich in zahlreiche Membranvesikel auf (*membrane blebbing*), die Teile des Zellinhalts enthalten (apoptotische Körperchen) [22]. Diese

können dann von phagozytotischen Zellen erkannt und aufgenommen werden. Da der Zellinhalt hier von der Membran umschlossen wird, kommt es durch Apoptose selten zur Auslösung einer Entzündungsreaktion.

### **1.2.1 Molekulare Mechanismen der Apoptose**

Am Ende der apoptotische Kaskade steht eine Reihe von Cystein-Proteasen, die als Caspasen bezeichnet werden. Diese sind in der Lage, eine Vielzahl von zellulären Substraten zu spalten [26]. Generell lassen sich dabei zwei unterschiedliche Aktivierungswege von Apoptose unterscheiden. Beim extrinsischen Signalweg werden sogenannte Todesrezeptoren an der Zelloberfläche aktiviert [27, 28]. Der intrinsische Signalweg wird dagegen durch verschiedene Formen von Stress ausgelöst, darunter Entzug von Wachstumsfaktoren oder verschiedene Arten von intrazellulären Schädigungen. Hier wird die Aktivierung von Caspasen durch eine Reihe modulatorischer Proteine reguliert, die zur Familie der Bcl-2-Proteine gehören.

#### **Caspasen**

Bisher wurden insgesamt 14 verschiedene Caspasen in Säugetieren beschrieben (Tab. 1.1). Sie erkennen spezifische Tetrapeptidsequenzen und spalten ihre Substrate an der Carboxyl-Seite von Aspartatresten. Synthetisiert werden sie als Proenzyme und werden durch proteolytische Spaltung aktiviert. Das voll aktive Enzym ist dann ein Heterotetramer bestehend aus zwei identischen Untereinheiten von ungefähr 20 kDa und zwei identischen Untereinheiten von ca. 10 kDa Größe [29, 30, 31]. Diese Untereinheiten können auch durch Selbstprozessierung bei Aggregation von Procaspasen entstehen. Diese sogenannten Initiator-Caspasen sind dann in der Lage weitere Caspasen zu prozessieren, die Effektor-Caspasen. Diese spalten und inaktivieren dann zahlreiche Signal- und Strukturproteine der Zelle, darunter DNA-Reparaturenzyme,

Lamin, Gelsolin, MDM2 (ein Inhibitor von p53) und Proteinkinase C  $\delta$  [26, 32]. Die Caspase-aktivierte DNase (CAD) wird normalerweise durch Bindung an ein Inhibitorprotein (iCAD) [33] gehemmt. Dieses wird durch die Caspase 3 degradiert [34], wodurch die Endonuclease frei wird, die dann den für die Apoptose charakteristischen internucleosomalen Verdau der DNA durchführt. Einige Caspasen entfernen eine negativ regulatorische Domäne von der Kinase PAK2 (p21-activated protein kinase 2) und tragen so zum *membrane blebbing* der Zelle bei [35]. Es gibt auch Caspasen, die bei der Apoptose nach heutigem Stand keine Rolle spielen. Sie sind hauptsächlich bei der Synthese von Zytokinen beteiligt.

### **Adapterproteine**

Adapterproteine stellen die Verbindung zwischen den Caspasen und den regulatorischen Proteinen der Apoptose, den Todesrezeptoren und Bcl-2-Proteinen her. Charakteristisch für ihre Struktur sind drei Domänen, die die Verbindung zwischen ihnen mit Caspasen oder Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie herstellen: Die Todesdomäne (*death domain*, DD), die Todeseffektordomäne (*death effector domain*, DED) und die Caspase-rekrutierende Domäne (*caspase recruiting domain*, CARD) [28, 36]. Diese Domänen finden sich ebenfalls auf den jeweiligen Bindungspartnern wieder. Die Todesdomäne kommt sowohl auf dem zytoplasmatischen Teil von CD95 und anderen verwandten Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie, als auch auf Adaptermolekülen wie der Fas-assoziierten Todesdomäne (FADD) der TNF-R1-assoziierten Todesdomäne (TRADD) und dem Rezeptor-interagierenden Protein (*receptor-associated protein*, RIP) vor. Die Verbindung zwischen Rezeptor und Adapterprotein über diese spezifischen Domänen führt zur Aggregation und Aktivierung von Caspasen [37, 38]. Die Rekrutierung und Aggregation der Caspasen selbst wird dagegen über die DED vermittelt. Sie ist sowohl in der FADD als auch als tandemartige Wiederholung in Procaspase 8 und 10 vorhanden. Die Trimerisierung von CD95 kann also

<b>Caspase</b>	<b>Peptid</b>	<b>Aktivator</b>	<b>Funktion</b>
<i>Initiator-Caspasen</i>			
Csp 2	DEHD	DEFCAP, RAIDD	mitochondrialer Stress
Csp 8	LETD	FADD	Rezeptor-Signalweiterleitung, Proliferation
Csp 9	LEHD	Apaf-1/cyt c	Csp 3/7-Aktivierung
Csp 10	LEND	FADD	Rezeptorsignalweiterleitung
Csp 12	WEHD	TRAF-2, calpain	ER-Stress
<i>Effektor-Caspasen</i>			
Csp 3	DEVD	Csp 9, 8	Abbau von Zellbestandteilen
Csp 6	VEHD	Csp 3, 7	Abbau von Lamin
Csp 7	DEVD	Csp 9, 8	Abbau von Zellbestandteilen
<i>Zytokin-reifende Caspasen</i>			
Csp 1	WEHD	Ipaf, ASC, Inflammasom	Zytokinsynthese, Apoptose
Csp 4	(WL)EHD		
Csp 5	(WL)EHD	Inflammasom	Zytokinsynthese, LPS-Stress

**Tabelle 1.1: Caspasen.** Nach ihrer Funktion lassen sich diese Proteasen in drei Gruppen einteilen. Jede Caspase erkennt ein für sie spezifisches Tetrapeptidmotiv. DEFCAP, *death effector filament-forming Ced-4 like apoptosis protein*, RAIDD, *RIP-associated protein with a death domain*, ASC, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*.

durch FADD zu einer Aggregation und Aktivierung dieser Caspasen führen.

Die Procaspasen 2 und 9 werden nicht über TNF-Rezeptoren aktiviert und besitzen auch keine DED. Sie enthalten die CARD, über die sie an ihren spezifischen Adapter Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) binden. Im intrinsischen Apoptose-Signalweg bildet dieser zusammen mit Cytochrom c und der Caspase 9 das sogenannte Apoptosom [39].



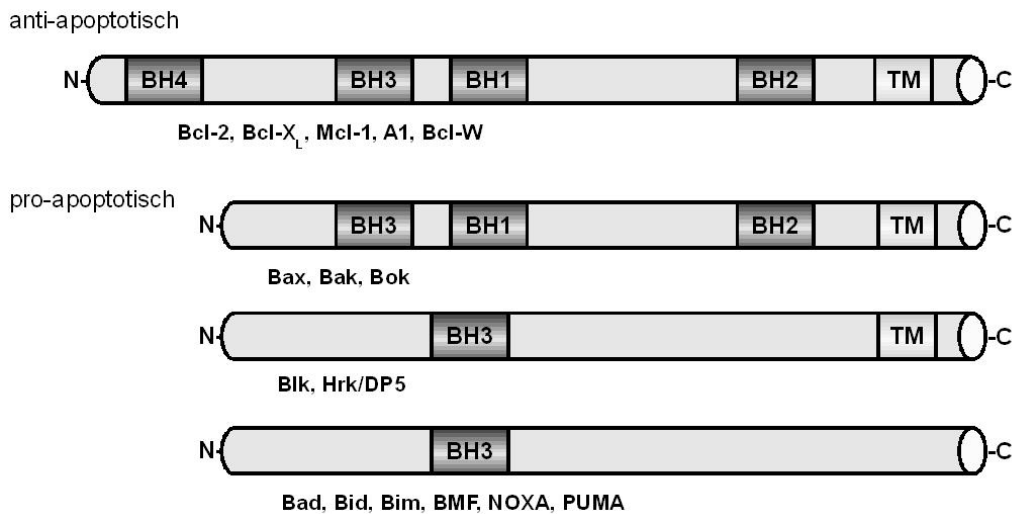
### **Bcl-2 Proteinfamilie**

Alle Mitglieder dieser Familie sind strukturell homolog zu *bcl-2* (*B-cell lymphoma 2*) und besitzen mindestens eine der vier konservierten Motive der *bcl-2* homologen Domänen (*bcl-2* *homology domains*, BH 1 bis 4). Sie sind verantwortlich für die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran und lassen sich in eine anti- und drei pro-apoptotische Subfamilien einteilen (Abb. 1.1). Die meisten der anti-apoptotischen *bcl-2* Proteine enthalten mindestens BH1 und BH2, Mitglieder mit höchster Homologie zu *bcl-2* enthalten alle vier Domänen. Die drei pro-apoptotischen Subfamilien unterscheiden sich stark hinsichtlich ihrer Homologie zu *bcl-2*. Bax, Bak und Bok enthalten die Domänen BH 1 bis 3, die acht anderen säuger-spezifischen pro-apoptotischen Proteine besitzen lediglich die BH3-Domäne. Diese ist essentiell für die pro-apoptotische Wirkung dieser Proteine [40, 41].

Die pro- und antiapoptotischen Mitglieder dieser Familie sind in der Lage, miteinander Heterotrimere zu bilden und sich so gegenseitig in ihrer Wirkung beeinflussen [43]. Ihre relative Konzentration könnte also als molekularer Sensor der Apoptose wirken.

### **Die TNF-Rezeptorfamilie**

Die Familie der TNF-Rezeptoren übernehmen unterschiedliche Aufgaben in der Zelle. Je nach Zelltyp und Signal vermitteln sie Proliferation, Überleben, Zelldifferenzierung und Apoptose. Sie werden aktiviert von einer Gruppe strukturverwandter Proteine die zur TNF-Ligandenfamilie gehören. Die meisten dieser Liganden werden als membranständige Trimere synthetisiert, und eine Bindung an den Rezeptor scheint für die Signalweiterleitung notwendig zu sein [28, 44, 45]. CD95 (Fas/APO-1) und der TNF-Rezeptor 1 (TNFR1), sowie andere Mitglieder dieser Familie besitzen eine DD, die essentiell für die Induktion von Apoptose ist. Mitglieder dieser Subfamilie werden auch als „Todesrezeptoren“ bezeichnet.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Bcl-2-Proteinfamilie.**

Die Struktur der Proteine ist linear dargestellt, BH1-4 bezeichnen die jeweiligen *bcl-2* homology domains, TM die carboxyterminale hydrophobe Transmembrandomäne. Die Bcl-2-Familie umfasst anti-apoptotische Proteine (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, A1 und Bcl-w) mit allen vier BH-Domänen und einer TM-Domäne, pro-apoptotische Proteine (Bax, Bak und Bok) mit den BH-Domänen 1 bis 3 und einer Transmembrandomäne, und pro-apoptotische Proteine mit nur der BH3 mit (Blk/Bik, Hrk/DP5) oder ohne (Bad, Bid, Bim, BMF, NOXA und PUMA) TM-Domäne. (nach [42], verändert)

**Die inhibitors of apoptosis proteins (IAP)**

Die *inhibitors of apoptosis proteins* (IAP) modulieren den Verlauf der Apoptose durch Bindung an und Inhibition von Caspasen. Sie wurden zuerst in Baculoviren beschrieben, wobei gezeigt wurde, dass sie die Apoptose in befallenen Wirtszellen unterdrücken können [46, 47]. Später wurden sie auch in Insekten und Vertebraten nachgewiesen. Die Proteine dieser Familie werden strukturell durch die BIR (*baculoviral IAP repeat*)-Domäne charakterisiert. Bis zu drei Kopien dieser Domänen können in den bisher beschriebenen Mitgliedern dieser Familie auftreten. Bis heute wurden sieben mensch-

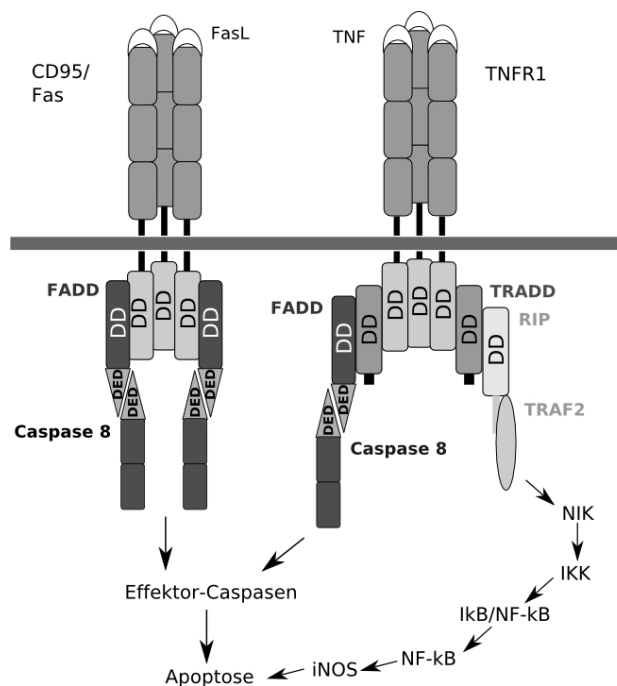
liche IAPs identifiziert: NAIP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP, ML-IAP, Survivin und BRUCE [48, 49, 50, 51, 52, 53]. XIAP, c-IAP1 und c-IAP2 sind in der Lage, die Caspasen 3, 7 und 9 direkt zu binden und damit potentiell zu inaktivieren [54, 55, 56]. Neben einer CARD-Domäne besitzen diese IAPs eine RING (*really interesting new gene*)-Domäne, die eine Ubiquitin-Ligaseaktivität aufweist. Diese scheint allerdings in Säugerzellen für die anti-apoptotische Aktivität keine Rolle zu spielen [55, 54, 57]. Für Survivin konnte gezeigt werden, dass es sich mit den Caspasen 3,7 und 9 copräzipitieren lässt, wodurch die durch Überexpression dieser Caspasen induzierte Apoptose unterdrückt wird [58].

### **Der extrinsische Signalweg**

Der extrinsische Signalweg wird durch die Aktivierung von Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie ausgelöst. Dabei sind die Rezeptoren CD95 (Fas/APO-1) und der TNFR1 am besten beschrieben [28]. Die Bindung von  $TNF\alpha$  resultiert in der Trimerisierung des TNFR1 und der Abspaltung eines Inhibitorproteins, dem *silencer of death domains* (SODD), was die anschließende Bindung von Adapterproteinen (TRADD und FADD) ermöglicht - es entsteht der sogenannte todesinduzierende Signalkomplex (*death inducing signalling complex*, DISC) [59]. Über FADD wird die Caspase 8 rekrutiert, die sich dann - vermutlich autokatalytisch - aktiviert [60]. Dies führt entweder zur direkten Aktivierung von Caspase 3 oder zur Aktivierung des intrinsischen Signalweges über die Spaltung des Bcl-2-Proteins Bid, welches an der äußeren Mitochondrienmembran zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren führt [61]. Neben der Caspase-Aktivierung aktiviert der TNFR1 auch Transkriptionsregulatoren wie  $NF-\kappa B$  und die Jun Kinase (JNK). TRADD bindet weitere Adaptermoleküle wie den TNF-assoziierten Faktor 2 (*TNF associated factor 2*, TRAF2) und RIP. TRAF löst dabei eine Kinase-Kaskade aus, die zur Aktivierung der JNK und zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-jun führt. Die Aktivierung von  $NF-\kappa B$  be-

ruht auf der Phosphorylierung von Inhibitorproteinen ( $I\kappa B$ ) durch den  $I\kappa B$  Kinase-Komplex. Die Aktivierung der IKK wird durch das Adapterprotein RIP reguliert.

Ähnliches gilt für die Signaltransduktion von CD95. Die Bindung von CD95L resultiert ebenfalls in der Rekrutierung der Caspase 8, was zur Induktion der fortlaufenden Caspase-Kaskade und zur Aulösung von Apoptose führt (Abb. 1.2).



**Abbildung 1.2: Die extrinsische Signalkaskade durch CD95 und TNF-R1.** Die Bindung von CD95L bzw.  $TNF\alpha$  an ihre Rezeptoren resultiert in der Aktivierung von Caspasen und des  $NF\kappa B$ -Signalwegs. Zu den Erläuterungen der Abkürzungen s. Text. (nach [28], verändert)

### Der intrinsische Signalweg

Mitochondrien nehmen im intrinsischen Signalweg der Apoptose eine zentrale Stellung ein. Bereits 1994 konnte gezeigt werden, dass diese Organellen zahlreiche pro-apoptotische Faktoren in das

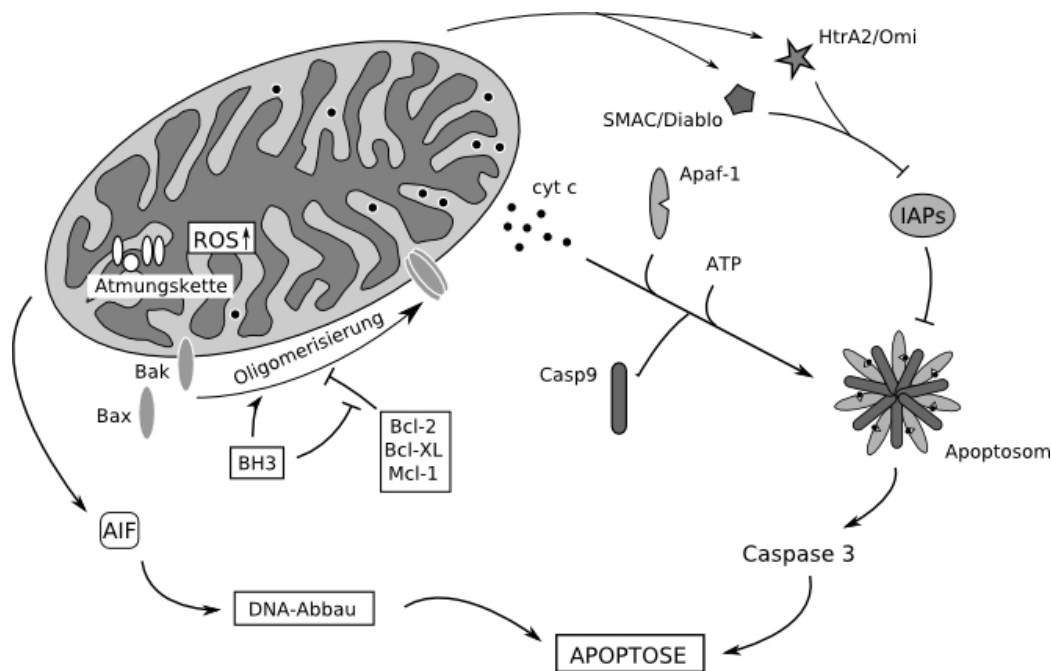
Zytoplasma freisetzen [62]. Dies erfolgt über die bcl-2-Proteine Bax und Bak, die entweder direkt durch Oligomerisierung Poren in den mitochondrialen Membranen bilden können oder die Durchlässigkeit der Membranen induzieren (*mitochondrial permeability transition*, MPT). Bax kommt normalerweise im Zytosol vor, unterliegt allerdings in der Apoptose einer Konformationsänderung, wird in die Membran transloziert und oligomerisiert dort [63, 64, 65]. Bak kommt bereits im Normalzustand in der Mitochondrienmembran vor. Es ändert in der Apoptose ebenfalls seine Konformation und bildet größere Aggregate [64, 65, 66, 67]. Der molekulare Mechanismus der MPT ist bisher ungeklärt, vermutet wird die Bildung eines Membrankanals (*mitochondrial permeability transition pore*, MPTP), der sich aus dem spannungsabhängigen Anionenkanal (*voltage-dependent anion channel*, VDAC, äußere Membran), dem Adenin Nukleotid Translokator (ANT, innere Membran) Cyclophilin D und möglicherweise anderen Proteinen zusammensetzt [68]. Die Bildung dieser Poren führt zum Ioneneinstrom aus dem Zytoplasma in den mitochondrialen Intermembranraum, wodurch es zum Abfall des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi$ ) kommt [69]. Der daraus resultierende osmotischen Wassereinstrom führt schließlich zur Auflösung der äußeren Membran, wodurch proapoptotische Faktoren in das Zytoplasma gelangen. Dazu gehören unter anderem Cytochrom c, SMAC/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases*), HtrA2/Omi *high temperature requirement protein A2*, AIF (Apoptose-induzierender Faktor) und die DNase G [70, 71]. In Anwesenheit von ATP findet eine Oligomerisierung von cyt c mit Apaf-1 statt. Dieser Komplex rekrutiert die Procaspase 9, die dadurch autokatalytisch aktiviert wird. Es entsteht eine radähnliche Proteinstruktur mit einer molekularen Masse von ungefähr 1 MDa, das sogenannte Apoptosom [39]. Dieses setzt dann die weitere Apoptose-Kaskade durch die Aktivierung der Caspase 3 in Gang [72] (Abb. 1.3). AIF reguliert die Apoptose dagegen Caspase-unabhängig, indem es in den Kern transloziert und die Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation indu-

ziert [73]. SMAC/DIABLO und HtrA2/Omi verhindern die Inhibition der Caspasen durch Bindung an die IAPs und tragen so zur Potenzierung der Apoptose bei, auch wenn sie diese nicht initiieren können [74, 75, 76].

Durch den Verlust von Cytochrom c kommt es zusätzlich zu einer Störung der mitochondrialen Atmungskette zwischen Komplex III und IV. Die Folge ist eine verstärkte Übertragung von Elektronen auf den terminalen Akzeptor Sauerstoff, wodurch in größerer Menge reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen [77]. Die Komplexe I und III sind die Hauptquellen zur Bildung von Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) und tragen so zum oxidativen Stress in der Zelle bei [78, 79]. Diese Oxide können die Eisen-Schwefel-Cluster von Enzymen wie Succinat-Dehydrogenase oder anderen Mitgliedern der Atmungskette angreifen und diese dadurch inhibieren [80]. Des Weiteren kann eine erhöhte ROS-Konzentration durch Peroxidation von Cardiolipin zu einer erleichterten Freisetzung von cyt c führen [81]. ROS werden auch über die Aktivierung von Rezeptoren der TNF-Familien gebildet [82]. Da Antioxidantien in der Lage sind, die ROS-vermittelte Apoptose zu inhibieren [83], wird die schädigende Wirkung von ROS wohl nicht nur direkt, sondern auch über die Apoptose-Kaskade vermittelt.

Neben den Mitochondrien spielt auch das Endoplasmatische Retikulum eine wichtige Rolle in der Apoptose. Hier kontrollieren bestimmte Mechanismen die korrekte Faltung der Proteine während ihrer Biosynthese. Der ER-Stress, ausgelöst durch eine gestörte Glykolisierung, fehlgefaltete Proteine oder gestörte Calciumhomöostase, löst den sogenannten *unfolded protein response* (UPR) aus. Dabei akkumulieren ungefaltete Proteine im Lumen des ER und binden an das molekulare Chaperon BiP/Grp78 (*glucose-regulated protein 78 kDa*). Dadurch kommt es zur Auflösung der Bindung zwischen BiP/Grp78 und Ire- $\alpha$ , eine Serin/Threonin-Kinase, die bei dieser Dissoziation oligomerisiert und sich autokatalytisch phosphoryliert [84]. Durch ihre N-terminale Nukleaseaktivität degradiert Ire- $\alpha$  die 28S-RNA, wodurch es zu einem Abbruch der Prote-

insynthese kommt [85]. Des Weiteren werden Transmembranproteine wie PERK (*protein kinase like endoplasmic reticulum kinase*) [86] und ATF-6 (*activating transcription factor-6*) aktiviert [87]. Ähnlich wie Ire- $\alpha$  wird PERK oligomerisiert und autophosphoryliert. Daraufhin aktiviert diese Kinase den Translations-Initiationsfaktor eIF2- $\alpha$ , was zu einer Verzögerung der Translation führt. Der UPR führt zu einer Spaltung von ATF-6, dessen zytosolische Domäne in den Kern transloziert wird und dort als Transkriptionsfaktor u.a. für Gene der molekularen Chaperone BiP/Grp78, Calreticulin, CHOP, sowie den Transkriptionsfaktor GADD fungiert [87]. Das ER ist das größte Speicherkompartiment für Calcium, wo es entweder frei oder gebunden an Calreticulin oder Calnexin vorliegen kann. Der Austritt von Calcium ist häufig mit der Aufnahme in Mitochondrien assoziiert, was oft mit dem Zelltod einhergeht [88]. Daran beteiligt sind Bcl-2 Proteine wie Bax oder Bak, die für die ER-Stress induzierte Apoptose nötig sind. Sie sind verantwortlich für die Ausschüttung von Calcium aus dem ER-Lumen und für seine Aufnahme in die Mitochondrien [89, 90]. Calcium-Ionen führen vermutlich auch zur Aktivierung der Caspase 12 [91]. Diese wird von Calpain angesteuert, einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Cysteinprotease. Obwohl dies ein Mechanismus für die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Apoptose darstellen könnte, ist die Beteiligung von Calpain nur schlecht belegt und die Prozessierung anderer Initiatorcaspasen reicht für die Aktivierung der Caspase 12 nicht aus [92]. Möglich wäre auch eine Aktivierung durch TRAF2 (*TNFR associated factor 2*), der mit der Caspase 12 interagiert und ihre Selbstprozessierung induziert [93]. Bisher wurde die Caspase 12 nur für Mäuse beschrieben. Es ist unklar, ob eine menschliche Form dieser Caspase existiert, oder ob ihre Funktion von anderen (Caspasen 4 oder 5) übernommen wird.



**Abbildung 1.3: Der intrinsische Signalweg der Apoptose.** Intrazellulärer Stress führt zur Auslösung der intrinsischen Signalkaskade durch die Schwächung der mitochondrialen Membran mittels pro-apoptotischen Bcl-2-Proteinen. Dies führt zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren und zur Aktivierung von Caspasen.

### 1.2.2 Rolle der Betazell-Apoptose beim Diabetes

Die pankreatische Betazellmasse wird von dem Zusammenspiel vier voneinander unabhängiger Mechanismen kontrolliert: Zellgröße, Proliferation, Neogenese aus Vorläuferzellen des pankreatischen Kanalsystems und Apoptose [94, 95]. Die Rate des Betazellwachstums ergibt sich dabei aus der Differenz der Summe von Proliferation, Neogenese und Zellgröße und der Apoptose [94, 96]. Die Betazellmasse zeigt sich dabei im Hinblick auf metabolische Schwankungen sehr adaptiv. Im Falle von schwangeren Nagern wurde gezeigt, dass sich die Betazell-Population nahezu verdoppeln kann, um die gesteigerten Anforderungen an den Metabolismus durch den sich entwickelnden Fötus zu kompensieren [97]. Ein ähnlicher



Vorgang wird auch beim Menschen vermutet [97]. Nach der Geburt vermindert sich die Betazell-Replikation, und eine gesteigerte Apoptose lässt die Betazellmasse wieder auf ein normales Niveau sinken [98].

Auch im Falle von Diabetes und Adipositas kann die Masse der Betazellen an die gesteigerten metabolischen Anforderungen adaptieren. Für den Menschen wird dies vermutlich durch eine Steigerung der Betazell-Replikation und -Neogenese, aber auch durch eine Hypertrophie der Zellen erreicht [99, 100]. Es tritt auch eine leichte Steigerung der Apoptose auf, die aber durch Proliferation und Neogenese ausgeglichen wird und in einer Vergrößerung der Betazellmasse resultiert [99].

Trotz dieser anfänglich vergrößerten Betazellmasse geht der Typ 2-Diabetes sowohl in Nagern als auch im Menschen mit einem starken Rückgang der Betazellmasse einher. Als eine Folge davon kann sich der Organismus nicht länger einer veränderten Stoffwechsellaage inklusive Insulinresistenz und Adipositas anpassen. Der Verlust der Betazellen beruht auf einer stark gesteigerten Apoptoserate, die nicht durch Replikation und Neogenese kompensiert werden kann [101, 99, 100, 102]. Im fortgeschrittenen Stadium vermindert sich zudem die Rate der Betazell-Replikation und es können sich beim Menschen Amyloidplaques in den Langerhans'schen Inseln bilden [103]. In schweren Fällen kann die Sekretionsleistung der Betazellen soweit minimiert sein, dass die Gabe von exogenem Insulin notwendig wird [104].

Viele Faktoren tragen zum Betazell-Verlust im Typ 2-Diabetes bei, darunter ER-Stress, chronische Hyperglykämie, chronische Hyperlipidämie, oxidativer Stress und einige Zytokine [101, 105, 100, 106].

### **Glukose**

Glukose ist der Hauptregulator der Insulinsekretion und steuert daher auch die Langzeit-Adaption der Insulinproduktion, indem

sie Einfluss auf die Betazellmasse ausübt. Tatsächlich lässt sich in allen Spezies konzentrationsabhängig durch eine kurzzeitige Behandlung mit Glukose eine gesteigerte Proliferation der Betazellen nachweisen [107, 108, 109]. Anhaltend hohe Glukosekonzentrationen vermindern dagegen diesen proliferativen Effekt und führen zu Apoptose. Hinsichtlich der kritischen Glukosekonzentration lassen sich allerdings Speziesunterschiede feststellen. In Pankreasinseln von Nagern lassen sich zwischen 5,5 und 11 mM Glukose noch proliferative Effekte zeigen [110], erst eine Konzentration von über 11 mM induziert Apoptose, allerdings in Abhängigkeit von den gewählten Kulturbedingungen [109, 110, 111]. Im Gegensatz dazu wird beim Menschen und bei der Sandratte *Psammomys obesus* ein linearer Anstieg der Betazell-Apoptose bei Glukosekonzentrationen zwischen 5,5 und 33 mM Glukose beobachtet [109, 112, 113]. Der Mechanismus dieser Glukosetoxizität ist vielfältig und noch nicht vollständig beschrieben. Diskutiert werden direkte Effekte der Glukose sowie eine Induktion von ER-Stress und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies.

Klinische Studien bringen Typ 2-Diabetes unter anderem mit oxidativem Stress in Verbindung [114, 115, 116, 117, 118, 119]. Gerade für die Betazelle ist dies kritisch, da sie zu den Zellen gehört, die nur ein sehr geringes Niveau an antioxidativen Schutzmechanismen aufweisen [120, 121]. Hohe Konzentrationen von Glukose verschiebt ihre Verstoffwechslung von der klassischen Glykolyse zu alternativen Abbauewegen. Dies beinhaltet die Autooxidation von Glycerinaldehyd, Proteinkinase C (PKC)-Aktivierung, die Bildung von Methylglyoxal, die zur Bildung von *advanced glycation end products* (AGE) führt und die Aktivierung des Hexosamin-Stoffwechsels [122]. Des Weiteren entsteht durch Glukose eine erhöhte Bildung von ROS - vor allem Superoxid-Anionen (1.2.1) - in den Mitochondrien über die oxidative Phosphorylierung und die Zellatmung [123].

Hohe Glukosespiegel induzieren in Betazellen die Bildung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  [124], welches autokrin auf die

Zellen selbst wirkt und die Expression von CD95 [112] induziert. Normalerweise verhindert die Anwesenheit des Caspase 8-Inhibitors FLIP (*FLICE inhibitory protein*) die Auslösung der Apoptose. Allerdings wird die Expression von FLIP bei hohen Glukosespiegeln herunterreguliert [125]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass hohe Glukosekonzentrationen (30 mM) einen moderaten UPR in isolierten Inseln von Ratten induzieren [126].

### **Freie Fettsäuren**

Unter normalen physiologischen Konzentrationen stimulieren freie Fettsäuren (FFA) die basale Insulinsekretion und tragen zur Potenzierung der Glukose-stimulierten Insulinsekretion (GSIS) bei. Allerdings können chronisch erhöhte FFA-Konzentrationen zu Schädigungen der Betazellen führen, der sogenannten Lipotoxizität. Zahlreiche *in vitro*-Studien zeigen die pro-apoptotischen Effekte von FFA, wobei dies abhängig vom Grad der Sättigung und der Kettenlänge der jeweiligen Fettsäure ist. Gesättigte Fettsäuren induzieren Apoptose [127, 128, 129, 130], ungesättigte wirken anti-apoptotisch [127, 129, 130]. Dieser Unterschied in ihrer Wirkung beruht möglicherweise auf der stärkeren Eignung von ungesättigten Fettsäuren zur Bildung von intrazellulären Triglyceriden, die protektiv wirken [131, 132]. Verschiedene Mechanismen der FFA-induzierten Apoptose werden vorgeschlagen, darunter die Bildung von Ceramid [133, 134, 128, 135], eine veränderte Lipidverteilung [129, 136, 137] und oxidativer Stress [138, 139, 140, 141]. Auch konnte gezeigt werden, dass Palmitat ER-Stress-Marker in insulinproduzierenden Zellen erhöht und die Morphologie des ER ändert, Oleat dagegen nicht [142, 143, 144]. Ebenso konnte eine Steigerung der Expression von ER-Stress-Markern in Inseln von *db/db*-Mäusen und in histologischen Schnitten von Pankreata von Typ 2-Diabetikern nachgewiesen werden [144].

Die apoptotischen Wirkungen von Glukose und FFA auf die Betazellen können sich gegenseitig synergistisch verstärken (Gluko-

lipotoxizität) [129]. Dies ist bedingt durch eine Inhibition der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren durch Glukose, was zu einer Akkumulation von Fettsäuren in der Zelle führt.

### **Zytokine**

Ebenso kann die Apoptose durch eine Reihe pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin- $1\beta$  (IL-1), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) oder TNF $\alpha$  induziert werden. Gerade beim Typ-1-Diabetes spielt IL-1 durch die Infiltration von Immunzellen in das Pankreasgewebe eine zentrale Rolle [145]. Chronisch erhöhte IL-1-Spiegel führen dabei zu einem fortschreitenden Betazell-Versagen und zum Zelltod [146]. Die IL-1-induzierte Betazell-Apoptose wird durch ein Zusammenspiel verschiedener Signalwege ausgelöst, darunter die MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinasen und den Nukleären Faktor (NF)- $\kappa$ B. Die Signaltransduktion durch IFN- $\gamma$  verläuft dagegen über die Aktivierung des JAK (Janus-Kinase) / STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Wegs. Die Signalwege beider Zytokine vereinigen sich auf gleicher Ebene und induzieren unter anderem die Expression der induzierbaren Stickoxid-Synthase (iNOS) (Abb. 1.4). Nach Bindung an seinen Rezeptor induziert IL-1 eine Konformationsänderung des Rezeptors, was die Bindung des akzessorischen Proteins IL-1AcP (*IL-1 receptor accessory protein*) ermöglicht, welches essentiell für die folgende Signalweiterleitung ist [147]. Daraufhin wird die IL-1 Rezeptor-aktivierte Kinase (IRAK) durch das Adapterprotein MyD88 an den Rezeptor rekrutiert [148]. IRAK interagiert mit dem TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) und aktiviert NF- $\kappa$ B über die Kinasen NIK (*NF- $\kappa$ B inducing kinase*) und IKK (siehe auch 1.2.1). NF- $\kappa$ B transloziert daraufhin in den Zellkern und induziert dort verschiedene Zielgene, darunter das der iNOS [149]. Ein zweiter Arm der IL-1-Signaltransduktion verläuft über die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk (*extracellular signal-related kinase*), p38 [150] und JNK (*c-jun N-terminal kinase*) [150, 151]. Erk und p38 können ebenfalls zur Induktion der iNOS beitra-

gen [150]. Das apoptotische Signal von JNK wird über den Transkriptionsfaktor ATF3 vermittelt, der in Zusammenhang mit der Zytokin-induzierten Apoptose von Betazellen steht [152] und induziert ebenfalls die Produktion von NO.

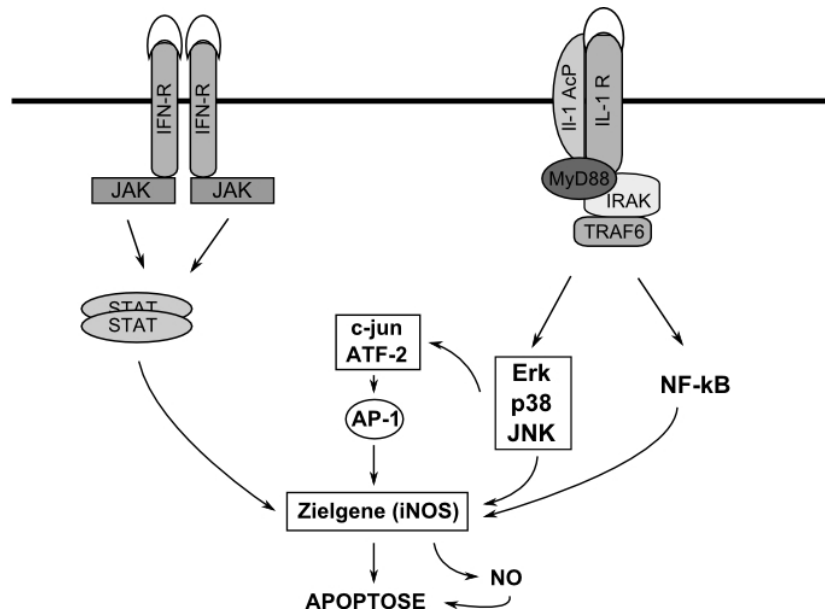
Stickstoffmonoxid führt in MIN6-Betazellen unter anderem zur Induktion von ER-Stress durch den Verlust an  $\text{Ca}^{2+}$  [153]. Es konnte gezeigt werden, dass Zytokine die Expression des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporters SERCA2b (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2*) reprimiert und Marker von ER-Stress induziert [154].

Neuere Untersuchungen belegen auch beim Typ-2 Diabetes eine Inflammation des endokrinen Pankreas. So konnte in Pankreasgewebe von Typ-2-Diabetikern und Tiermodellen eine erhöhte Infiltration durch Makrophagen beobachtet werden [155]. Hohe Glukose- und Fettsäurespiegel erzeugen in kultivierten Pankreasinseln eine Sekretion inflammatorischer Faktoren, wie die Chemokine IL-8 und MIP-1 $\alpha$ , die vermutlich zur Attraktion von Makrophagen beitragen [155]. Weiterhin induzieren hohe Glukosespiegel die Sekretion von IL-1 $\beta$  durch die Betazellen selbst [124], welches dann autokrin wirken kann.

### 1.3 Glucagon-like peptide 1

Glucagon-like peptide 1 (Glp-1) ist eines von zwei bisher bekannten Hormonen, die wesentlich zum sogenannten Inkretineffekt (1.3.1) beitragen. Es wurde zuerst Anfang der 1980er Jahre durch die Klonierung von cDNA und dem Gen von Proglucagon entdeckt. Seine biologischen Aktivitäten umfassen die Stimulation der Glukose-abhängigen Insulinsekretion und der Insulinbiosynthese, die Inhibition der Glukagonsekretion und der Magenentleerung und eine Verminderung der Nahrungsaufnahme. Des Weiteren zeigt es einen positiven Einfluss auf den Erhalt der Betazellmasse (1.3.6). Diese Eigenschaften machen es attraktiv für seinen Einsatz als Antidiabetikum.

Wesentliche Stellgrößen für seine Regulation sind die Sekretion



**Abbildung 1.4: Signaltransduktion der Zytokin-induzierten Apoptose.** Die Bindung von IL-1 und IFN $\gamma$  an ihre Rezeptoren induziert die Expression von Zielgenen, darunter das der iNOS.

von Glp-1 nach Nahrungsstimulus und der N-terminale Abbau des Peptids durch die Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP-4, 1.3.2).

Bedingt durch seine kurze Halbwertszeit sind mittlerweile Analoga von Glp-1 in therapeutischen Entwicklung und im Einsatz, die an den Glp-1-Rezeptor binden und resistent gegen eine proteolytische Degradation sind (1.3.3).

### 1.3.1 Der Inkretineffekt

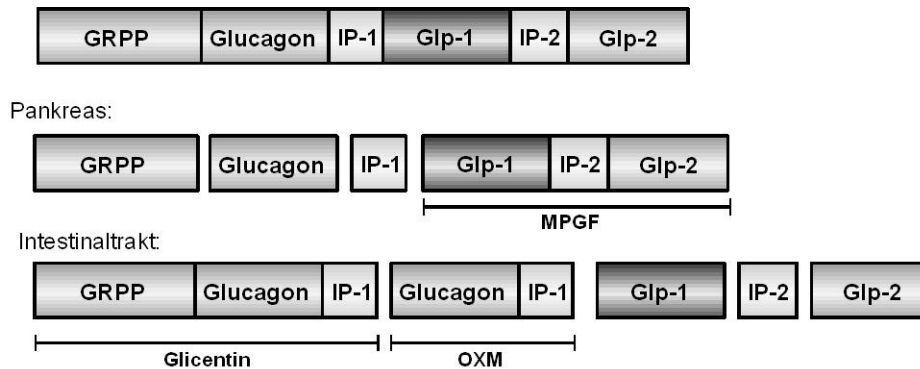
Die Beobachtung, daß sich bei oraler Gabe von Glukose ein höherer Insulinspiegel im Blutplasma einstellt als bei intravenöser Applikation der gleichen Menge Glukose, wird als Inkretineffekt bezeichnet. Verantwortlich dafür sind zwei insulinotrope Peptidhormone, die von der Mucosa des Ileum und des Colon sezerniert werden. Zuerst beschrieben wurde die Wirkung von GIP (früher *ga-*

*stric inhibitory peptide*, jetzt *glucose-dependent insulintropic peptide*) [156]. Allerdings reicht die stimulatorische Wirkung von GIP nicht aus, um den gesamten Inkretineffekt zu erklären. Die Klonierung und Aufklärung des Glukagon-Gens führte zur Entdeckung eines weiteren Inkretinhormons, dem *glucagon-like peptide-1* (Glp-1) [157].

### 1.3.2 Synthese, Sekretion und Degradation

Glp-1 wird in seinen biologisch aktiven Formen Glp-1(7-36)amid und Glp-1(7-37) von neurosekretorischen L-Zellen des Ileum und des Colon, aber auch vom Pankreas gebildet und in den Blutkreislauf abgegeben [158]. Strukturell geht es aus dem Proglucagon hervor, welches in den jeweiligen Geweben unterschiedlich prozessiert wird [159]. So entsteht in den  $\alpha$ -Zellen des Pankreas hauptsächlich Glucagon, GRPP (*glicentin-related polypeptide*) und MPGF (*major proglucagon peptide*), im Intestinaltrakt dagegen Glp-1, Glp-2 (im Gegensatz zu Glp-1 kein Inkretinhormon, sondern ein intestinaler Wachstumsfaktor), Glicentin und Oxyntomodulin (Abb. 1.5). Die Sekretion von Glp-1 wird durch Bestandteile der Nahrung wie z.B. Glukose stimuliert [160], allerdings nur, wenn diese oral aufgenommen werden. Der genaue Mechanismus der Stimulation durch Glukose ist bisher noch nicht geklärt, es wird aber eine Beteiligung von Geschmacksrezeptoren auf den L-Zellen und dem G-Protein *gustducin* vermutet [161]. Fettsäuren können ebenfalls beim Menschen die Glp-1-Sekretion erhöhen, wobei einfach ungesättigte Fettsäuren den stärksten Effekt zeigen [162]. Auch hier ist das Wissen über den molekularen Mechanismus begrenzt. Die Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors wird in einer Studie diskutiert [163].

Glp-1 wird durch die Dipetidyl-Peptidase 4 (DPP-4) proteolytisch abgebaut [165], was einen zentralen Kontrollmechanismus für die Wirkung von Glp-1 darstellt. Das Substrat für die DPP-4 ist ein hochkonservierter Alanin-Rest an Position 2, der sich auch



**Abbildung 1.5: Schematische Struktur von Proglucagon und seine Prozessierung in Pankreas und Intestinaltrakt.** GRPP: *glicentin-related polypeptide*, IP: *intervening peptide*, MPG: *major proglucagon peptide*, OXM: Oxyntomodulin. (nach [164], verändert)

in den Aminosäuresequenzen von GIp-2 und GIP wiederfindet. Die Inhibition der DPP-4 führt in Hunden zu einer Stabilisierung von nicht-degradiertem GIp-1 und GIP, das Gesamtniveau der Inkretine senkt sich dabei allerdings ab. Dies liegt möglicherweise an einer rückgekoppelten Inhibition der GIp-1-Sekretion [166]. Die mit dem Abbau verbundene Halbwertszeit von GIp-1 macht dieses Peptid ungeeignet für seinen therapeutischen Einsatz. Die Entwicklung von DPP-4-resistenten GIp-1-Mimetika (1.3.3) und DPP-4-Inhibitoren stehen deshalb im Fokus der pharmazeutischen Forschung.

### 1.3.3 GIp-1 Mimetika

#### Exendin-4

Exendin-4 (Exenatide) ist ein natürlich vorkommendes Peptid aus dem Gift der Krustenechse *Heloderma suspectum* [167] und bisher das am besten beschriebene GIp-1 Mimetikum. Es trägt seinen Namen aufgrund der Tatsache, dass es zwar aus den **exon**krienen Drüsen isoliert wurde, aber **endokrine** Wirkungen aufweist. Zum



nativen Glp-1 ist Exendin-4 zu ca. 53 % homolog und kann an den Glp-1-Rezeptor binden. Es ist daher kaum verwunderlich, dass es auch ähnliche funktionelle Eigenschaften mit sich bringt [168, 169, 170]. Im Gegensatz zu Glp-1 hat Exendin-4 ein Glycin an Position 2, ist somit kein Substrat für die DPP-4 und besitzt damit eine relativ lange Halbwertszeit in menschlichem Blutplasma [171], was mit einer verlängerten Wirkdauer einhergeht. Eine trunkierte Version, das Exendin(9-39), bindet an den Glp-1-Rezeptor, ohne ihn zu aktivieren und dient daher als Rezeptor-Antagonist [172].

### **AVE-0010**

AVE-0010 (ZP10A) ist ein Exendin-4-Analog, dessen aminoterminal Ende modifiziert wurde. Dadurch erhält es eine 4-fach höhere Affinität zum Glp-1-Rezeptor im Vergleich zu Glp-1 selbst [173]. In diabetischen Mäusen verbessert es die Glukosetoleranz, erhöht die Plasmakonzentration von Insulin durch eine verstärkte Insulinsynthese und vermindert die Konzentration von glykosiliertem Hämoglobin (HbA<sub>1c</sub>) [173].

### **Weitere Glp-1 Mimetika**

Neben der Stabilität des Moleküls ist es von Interesse, die Wirkungsdauer von Glp-1 zu verlängern.

Liraglutide (NN2211) ist ein Glp-1 Analog, welches an Position 16 kovalent mit einer C16-Fettsäure acetyliert ist. Als Folge davon kann es im Körper leicht an Albumin gebunden werden und erfährt dadurch eine verlangsamte Aufnahme und damit ein verlängertes Wirkprofil [174]. Zur Zeit befindet sich Liraglutide in Phase 3 der klinischen Untersuchung. Ähnliche Konstrukte sind CJC-1131 [175] und Albugon [176].

Bei CJC-1134 wurde Albumin direkt kovalent an Exendin-4 gebunden, was ebenso zu einer Verlängerung seiner Wirkung führt. [177].

Weitere stabile Glp-1 Analoga sind BIM51077 [178] und LY315902 [179].

### **1.3.4 Der Glp-1 Rezeptor**

Die Wirkung von Glp-1 wird über seinen spezifischen Rezeptor vermittelt, der erstmals aus cDNA von Inselzellen der Ratte [180] kloniert wurde. Der Rezeptor besteht aus 463 Aminosäuren und gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Seine Sequenz enthält eine große hydrophile extrazelluläre Domäne und sieben hydrophobe, membrangägige Domänen, die durch hydrophile intra- und extrazelluläre Schleifen vernetzt sind. Verschiedene Aminosäuren in der aminoterminalen Region des Rezeptors sind essentiell für die Ligandenbindung [181, 182, 183], ebenso wie die Region um die Transmembrandomänen 1-3 [184]. Einige Abschnitte innerhalb der dritten intrazellulären Schleife sind für die G-Protein Bindung und Aktivierung verantwortlich [185].

Der Glp-1 Rezeptor lässt sich in vielen Geweben nachweisen, darunter pankreatische Inselzellen, Gehirn, Herz, Nieren und der Gastrointestinaltrakt [186, 187].

Der Glp-1 Rezeptor ist funktionell an die Adenylatzyklase gekoppelt [188], Glp-1 aktiviert aber auch in einigen Zelltypen die Phospholipase C, die PI3-K und den MAPK-Signalweg [189, 180, 190, 191]. Weiterhin stimuliert es den Kalziumeinfluss, was zu einer erhöhten Konzentration freier intrazellulärer Kalziumionen führt [192]. Der Rezeptor kann an verschiedene G-Proteine gekoppelt vorliegen, darunter hauptsächlich  $G\alpha_s$ , aber auch  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_o$  [189, 185].

### **1.3.5 Wirkung von Glp-1 auf die Betazelle**

Auf Ebene der Betazelle führt die Bindung von Glp-1 an seinen Rezeptor zur Aktivierung der Adenylatzyklase. Als Folge davon wird die Insulinsekretion durch folgende Signale stimuliert: (1) Direk-

te Inhibition von  $K_{ATP}$ -Kanälen, was zu einer Depolarisation der Betazell-Membran führt; (2) Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Niveaus durch den Glp-1-vermittelten Einstrom von Kalzium durch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle und der Mobilisierung von intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speichern; (3) Steigerung der mitochondrialen ATP-Synthese, was zu einer weiteren Membrandepolarisierung führt; (4) Verschließen spannungsabhängiger  $K^+$ -Kanäle (Kv) und (5) direkte Effekte auf die Exozytose von Insulin-Speichervesikeln [193]. Der primäre Effektor der Glp-1-vermittelten Insulinsekretion ist hier cAMP, und dieser Effekt kommt entweder durch die Phosphorylierung von Substraten der PKA oder PKA-unabhängig durch die Aktivierung von Epac2 (*exchange factor directly activated by cAMP* 2). Dadurch wird  $Ca^{2+}$  aus dem ER durch die Aktivierung intrazellulärer Rezeptoren, wie Ryanodin- oder Phosphoinositol (3,4,5) triphosphat-Rezeptoren, freigesetzt [192].

Glp-1 stimuliert ebenfalls die Insulinbiosynthese durch Steigerung der Transkription, Translation und durch die Stabilisierung der Insulin-mRNA [188, 194]. Dies beruht sowohl auf PKA-abhängigen als auch auf PKA-unabhängigen Mechanismen, sowie durch Steigerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel [188, 195]. Pdx-1 (*pancreatic duodenum homeobox-1*), ein Transkriptionsfaktor der essentiell für die Entwicklung des Pankreas und der Aufrechterhaltung seiner Funktion ist, spielt ebenfalls eine Rolle bei der durch Glp-1 vermittelten Steigerung der Insulinbiosynthese. Glp-1 induziert die Expression von Pdx-1 und seine Bindung an den Insulinpromotor [196, 197].

Des Weiteren ist Glp-1 in der Lage, zuvor Glukose-resistente Betazellen wieder in einen Glukose-sensitiven Zustand zu versetzen [198].

### **1.3.6 Die antiapoptotische Wirkung von Glp-1**

Neben der Verbesserung der Funktion der Betazelle hat Glp-1 eine positive Wirkung auf den Erhalt der Betazellmasse durch eine Stei-

gerung der Betazell-Proliferation und durch Inhibition von Apoptose. Die anti-apoptotische Aktivität von Glp-1 konnte in kultivierten Betazelllinien [199], in Tiermodellen [200] und in humanen Pankreasinseln [201] nachgewiesen werden und das Hormon zeigte sich aktiv gegen verschiedene apoptotische Stimuli wie Streptozotocin [202], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [199], Glukose [112], freie Fettsäuren [142] und Zytokine [203].

Als mögliche Signalwege der durch Glp-1 vermittelten anti-apoptotischen Wirkung wird eine Beteiligung der Proteinkinase B (Akt) oder der Proteinkinase A (PKA) vorgeschlagen. In einer Betazelllinie konnte durch den Einsatz von Inhibitoren gegen die PI3-Kinase, die in der Signalkaskade oberhalb der Akt liegt, und gegen die Adenylatcyklase der anti-apoptotische Effekt von Glp-1 gegen durch oxidativen Stress induzierte Apoptose aufgehoben werden [199]. Die Überexpression einer funktionell inaktiven Mutante der Akt bewirkte eine Aufhebung des anti-apoptotischen Effekts von Glp-1 nach Induktion von Apoptose mit Staurosporin, einem Kinase-Inhibitor [204]. Möglicherweise wird die Akt durch eine Transaktivierung des EGF (*endothelial growth factor*)-Rezeptors aktiviert [205], dies wurde aber bisher nicht direkt belegt. Die Akt spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Zellwachstum und Metabolismus. Knock-out-Modelle zeigten unter anderem ein retardiertes Wachstum [206] oder die Entwicklung eines Diabetes mellitus [207, 208] in Mäusen. Die Inhibition von Apoptose erfolgt durch diese Kinase möglicherweise über die Phosphorylierung der Caspase 9 [209] und des bcl-2-Proteins Bad [210].

Andere Studien belegen die Beteiligung der PKA an der anti-apoptotischen Wirkung von Glp-1 [211]. Die Steigerung intrazellulärer cAMP-Spiegel durch Forskolin oder cAMP-Analoga bewirkte dosisabhängig die Inhibition FFA-induzierter Apoptose mittels eines PKA-abhängigen und eines PKA-unabhängigen Wegs. Niedrige Konzentrationen, hervorgerufen durch Glp-1 oder Exendin-4, wurden vornehmlich über die PKA vermittelt, hohe Konzentrationen, durch Forskolin oder IBMX hervorgerufen, stimulierten Epac (siehe auch

1.3.5). Die PKA ist ebenfalls an der Phosphorylierung von Bad beteiligt [212], und könnte auf diesem Weg an der anti-apoptotischen Wirkung von Glp-1 beteiligt sein [213]. Ebenso wird über die PKA die Wirkung von Exendin-4 gegen ER-Stress vermittelt [214].

## **1.4 Ziel der Arbeit**

Die anti-apoptotische Wirkung von Glp-1 auf die Betazelle ist bereits seit einigen Jahren bekannt. Doch der eigentliche Wirkmechanismus konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden, auch wenn verschiedene Signalwege in der Diskussion stehen.

In der vorliegenden Arbeit sollten mithilfe der Proteomanalyse weitere Zielproteine identifiziert werden, die bei der durch Glp-1 vermittelten anti-apoptotischen Wirkung eine Rolle spielen könnten. Dazu sollte die Methode der differenzierten Gelelektrophorese eingesetzt werden, um Aussagen über die Expressions-Veränderung durch Glp-1 treffen zu können. Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Untersuchung von Zytokin-induzierter Apoptose an der Betazelle eingesetzt. Des Weiteren sollte am Modell der INS-1 Zelle die Relevanz der Akt und der PKA für die durch Glp-1RA hervorgerufene anti-apoptotische Wirkung untersucht werden.

Insulinanaloga besitzen ebenfalls die Fähigkeit, Zytokin- und Fettsäure-induzierte Apoptose in Betazellen zu hemmen, und die geschieht mit höchster Wahrscheinlichkeit über den Akt-Signalweg. Ein weiteres Ziel war es herauszufinden, ob Insulinanaloga und Glp-1RA über gleiche Signalwege anti-apoptotisch wirken, oder ob ihre jeweilige Wirkung durch gleichzeitige Inkubation verstärkt wird.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Acetonitril	Merck, Darmstadt
Aminohexansäure	Sigma-Aldrich, Seelze
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Seelze
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Seelze
Ammoniumphosphat	Sigma-Aldrich, Seelze
AVE-0010	Sanofi-Aventis, Frankfurt
bovines Serumalbumin (BSA)	Applichem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA, fettsäurefrei Fraktion V	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Butanol	Merck, Darmstadt
Calcimchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
CHAPS	Sigma-Aldrich, Seelze
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Seelze
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Seelze
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich, Seelze
Exendin-4	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Forskolin	Sigma-Aldrich, Seelze
Glucagon-like Peptide 1 7-36(amide)	Bachem, Weil-am-Rhein
Glukose	Merck, Darmstadt
Glukose-6-phospat	Sigma-Aldrich, Seelze
Glycerol	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma-Aldrich, Seelze
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, Seelze
Humaninsulin	Sanofi-Aventis, Frankfurt
IBMX	Sigma-Aldrich, Seelze
Interleukin-1 $\beta$	tebu-bio, Offenbach
Interferon- $\gamma$	Chemicon, Hamshire, GB

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

Insulin Glulisin	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Insulin Glargin	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Insulin-like growth factor 1	Biomol, Hamburg
Insulin Lispro	Sanofi-Aventis, Frankfurt
INT	Sigma-Aldrich, Seelze
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Applichem, Darmstadt
Mannitol	Sigma-Aldrich, Seelze
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Methanol	Applichem, Darmstadt
Natriumcacodylat	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumchlorid	Applichem, Darmstadt
Natriumdisulfit	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpalmitat	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumsulfit	Sigma-Aldrich, Seelze
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt
Propidiumjodid (PI)	Sigma-Aldrich, Seelze
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Applichem, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich, Seelze
Titanoxidsulfat	Sigma-Aldrich, Seelze
Tris	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich, Seelze
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Seelze
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20	Applichem, Darmstadt

### 2.1.2 Fertigprodukte

Ac-DEVD-AMC Caspase 3 Substrat	BD Biosciences, Heidelberg
Ac-DEVD-CHO Caspase 3 Inhibitor	BD Biosciences, Heidelberg
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Complete Proteasen-Inhibitor	Roche, Mannheim
CM-DH <sub>2</sub> DCFDA	Invitrogen, Karlsruhe
Cy-Dye DIGE Fluor Cyaninfarbstoffe	GE Healthcare, München
ExcelGel SDS Buffer Strips	GE Healthcare, München
Fötales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
GelBond PAGfilm	GE Healthcare, München
Immobilon ECL-Substrat	Millipore, Schwalbach
IPG-Puffer	GE Healthcare, Freiburg
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
PhosStop Phosphatasen-Inhibitor	Roche, Mannheim
Prestained Proteinmarker	NEB, Frankfurt a.M.
PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach
RPMI mit Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI ohne Glucose	Sigma, Deisenhofen
RPMI ohne Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Uptilight HRP ECL-Substrat	KMF, Lohmar

### 2.1.3 Kit-Systeme

Cyclic AMP (low pH) Immunoassay	R&D Systems, Wiesbaden
Ultrasensitive Rat Insulin ELISA	Mercodia, Uppsala, Schweden

### 2.1.4 Antikörper



### ***primäre Antikörper***

Akt (Kaninchen)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Akt 1 (Maus)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Akt 2 (Kaninchen)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Akt 3 (Kaninchen)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
BiP/Grp78 (Kaninchen)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
phospho-Akt (Kaninchen)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
$\alpha$ -Tubulin (Maus)	Calbiochem, Darmstadt

### ***sekundäre Antikörper***

Kaninchen IgG-HRP (Ziege)	Promega, Mannheim
Maus IgG-HRP (Ziege)	Promega, Mannheim

### **2.1.5 Puffer**

Anodenpuffer I	300 mM Tris
	20 % (v/v) Methanol
	gelöst in H <sub>2</sub> O
Anodenpuffer II	25 mM Tris
	20 % (v/v) Methanol
	gelöst in H <sub>2</sub> O
Aufschlusspuffer	10 mM Tris/HCl, Ph 7,4
	225 mM Mannitol
	75 mM Saccharose
	0,5 mM EGTA
	0,5 mM DTT
	gelöst in H <sub>2</sub> O
cAMP-Stimulationspuffer	25 mM HEPES pH 7,4
	125 mM NaCl

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

	1,28 mM	CaCl <sub>2</sub>
	5,9 mM	KCl
	1,2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	Glukose
		gelöst in H <sub>2</sub> O
Caspase 3-Assaypuffer	20 mM	HEPES, pH 7,5
	10 % (v/v)	Glycerin
	2 mM	DTT
		gelöst in H <sub>2</sub> O
Caspase 3-Lysispuffer	10 mM	Tris/HCl, pH 7,4
	10 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
	130 mM	NaCl
	10 mM	NaPP <sub>i</sub>
	1 % (v/v)	Triton-X 100
		gelöst in H <sub>2</sub> O
DCF-Lysispuffer	1 mM	EDTA
	0,1 % (v/v)	Triton-X 100
		gelöst in PBS, pH 7,4
Fiske-Subbarow-Reagenz	0,72 M	Natriumdisulfit
	10 mM	1-Amino-2-hydroxy- naphtalin-4-sulfonsäure
	100 mM	Natriumsulfit
		gelöst in H <sub>2</sub> O
Fiske-Reagenz	3,75 ml	Fiske-Subbarow-Reagenz
	10 ml	Perchlorsäure (60 %)
	86,25 ml	Ammoniumheptamolybdat (0,48 % (w/v) in H <sub>2</sub> O)
IPG-Rehydrationspuffer	2 % (w/v)	CHAPS

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

	0,4 % (w/v)	DTT
	8 M	Harnstoff
	2 M	Thioharnstoff gelöst in H <sub>2</sub> O
Kathodenpuffer	40 mM	Aminohexansäure
	0,01 % (w/v)	SDS
	20 % (v/v)	Methanol gelöst in H <sub>2</sub> O
KRBH	10 mM	HEPES pH 7,5
	135 mM	NaCl
	3,6 mM	KCl
	0,5 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	0,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1,5 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,1 % (w/v)	BSA gelöst in H <sub>2</sub> O
Laemmli-Puffer	250 mmol/l	Tris pH 6,8
	40 % (v/v)	Glycerin
	8 % (w/v)	SDS
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
	10% (v/v)	2-Mercaptoethanol gelöst in H <sub>2</sub> O
Mitochondrien-Lysispuffer	25 mM	Tris
	4 %	CHAPS
	8 M	Harnstoff
	4 M	Thioharnstoff gelöst in H <sub>2</sub> O
PBS	138 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

	8 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		gelöst in H <sub>2</sub> O, pH 7,4
Resuspensions-Puffer	10 mM	Tris/HCl, pH 7,4
	250 mM	Saccharose
	0,5 mM	EGTA
	0,5 mM	DTT
		gelöst in H <sub>2</sub> O
TBS	10 mM	Tris/HCl, pH 7,4
	100 mM	NaCl
		gelöst in H <sub>2</sub> O
TBST	0,1 % (v/v)	Tween-20
		gelöst in TBS, pH 7,4
Triton-Lysispuffer	50 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	0,5 % (v/v)	Triton-X 100
	2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	150 mM	NaCl
	4 % (v/v)	Complete Protease-Inhibitor
	10 % (v/v)	PhosStop Phosphatase-Inhibitor
		gelöst in H <sub>2</sub> O
Verdauungspuffer	10 mM	Ammoniumbicarbonat
		gelöst in H <sub>2</sub> O

### 2.1.6 Zellkulturmedien

INS-1 Kulturmedium	500 ml	RPMI
	10 % (v/v)	FCS, hitzeinaktiviert

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

	100 U/ml	Penicillin
	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Streptomycin
	2 mM	Glutamin
	1 mM	Natriumpyruvat
	50 $\mu\text{M}$	2-Mercaptoethanol
INS-1 Hungermedium	500 ml	RPMI
	0,1 % (w/v)	BSA, fettsäurefrei
	100 U/ml	Penicillin
	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Streptomycin
	2 mM	Glutamin
	1 mM	Natriumpyruvat
	50 $\mu\text{M}$	2-Mercaptoethanol

### 2.1.7 Geräte

Blot-Apparatur	Nova Blot	GE Lifesciences, München
Elektrophorese-Apparatur	Ettan Dalt twelve	GE Lifesciences, München
Elektrophorese-Apparatur	Multiphor II	GE Lifesciences, München
Fluoreszenz-Lesegerät	Fluostar-P	SLT Labsystems, Crailsheim
Fluoreszenz-Mikroskop	IRB	Carl Zeiss, Jena
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Horizontal-Schüttler	WT12	Biometra, Göttingen
Laser-Scanner	Typhoon 9400	GE Lifesciences, München
Lumineszenz-Detektor	LumiImager	Roche, Mannheim
Massenspektrometer	Ultraflex	Bruker Daltonics, Bremen
Mikrotiterplatten-Leser	Model 550	BioRad, München
Spektrophotometer	BioMate 3	Fischer Scientific, Schwerte
Spot-Picker	GelPix	Genetix, New Milton
Target für die Massenspektrometrie	AnchorChip	Bruker Daltonics, Bremen
Tischzentrifuge	pico	Heraeus
Ultrazentrifuge	Optima L-60K	Beckman

Überkopf-Schüttler	Reax 2	Heidolph
Zellkultur-Inkubator	Hera cell 240	Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge	Rotanta R	Hettich, Bäch

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von INS-1 Betazellen

INS-1 ist eine Insulinoma-Zelllinie der Ratte und wurde 1992 von Asfari et al. [215] generiert. Die Mercaptoethanol-abhängige Zelllinie sekretiert Insulin konzentrationsabhängig nach Glukosestimulus und eignet sich daher gut als Modell der Betazelle. In dieser Arbeit wurden INS-1-Zellen in den Passagen 90-110 verwendet. Zur Stammhaltung wurden die Zellen adhärent in T175-Zellkulturflaschen mit 35 ml Kulturmedium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten. Zweimal pro Woche wurden die Zellen passagiert, dazu wurden sie mit 10 ml Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und für ca. 1 min bis zur Ablösung vom Flaschenboden inkubiert. Der Vorgang wurde mit 10 ml Kulturmedium abgestoppt und die Zellen bei 800 rpm für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Ein kleines Aliquot wurde für die Bestimmung der Zellzahl (2.2.2) abgenommen. Zur weiteren Kultivierung wurden 4 Mio. Zellen in T175-Zellkulturflaschen ausgesät. Medienwechsel erfolgten standardmäßig alle 2 Tage.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt. Dazu wurden 10  $\mu$ l der Zellsuspension nach der Trypsinisierung (2.2.1) abgenommen, mit 90  $\mu$ l Kulturmedium gemischt und zu 100  $\mu$ l einer 2 %-igen Trypanblaulösung gegeben. Diese Suspension wurde auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Es wurden die Trypanblau-negativen Zellen in insgesamt 4 Großquadranten gezählt und die Zellzahl wie folgt berechnet:

$$\frac{ZZ \times VV \times Vol}{4} = Zellen/ml$$

(ZZ: gezählte Zellen, VV: Vorverdünnung, Vol: Volumen eines Großquadrates)

### **2.2.3 Induktion von Apoptose durch Zytokine**

INS-1 Zellen wurden in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro well in 6-well Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 60 % kultiviert. Anschließend wurde das Medium gegen Hungermedium ausgetauscht und die Zellen für 5 h mit verschiedenen Konzentrationen von Glp-1 Rezeptoragonisten vorbehandelt. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Zugabe von 4 ng/ml IL-1  $\beta$  und 1 ng/ml IFN- $\gamma$  für 22 h.

### **2.2.4 Induktion von Apoptose durch Fettsäuren**

INS-1 Zellen wurden in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro well in 6-well Platten ausgesät und bis zu 60 % Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden anschließend für 5 h mit Glp-1 Rezeptoragonisten in Hungermedium vorbehandelt. Um Apoptose zu induzieren, wurden die Zellen für 18 h mit 500  $\mu$ M Palmitinsäure, gekoppelt an BSA, in Anwesenheit der Glp-1RA inkubiert. Zur Herstellung des fettsäurehaltigen Mediums wurde 100 mM Natriumpalmitat bei 65 °C in *H<sub>2</sub>O* *bidest.* gelöst, zu RPMI-Medium mit 2 % (w/v) fettsäurefreiem BSA gegeben und für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Das molare Verhältnis zwischen Palmitat und BSA betrug danach 3:1.

### **2.2.5 Induktion von Apoptose durch hohe Glukosespiegel**

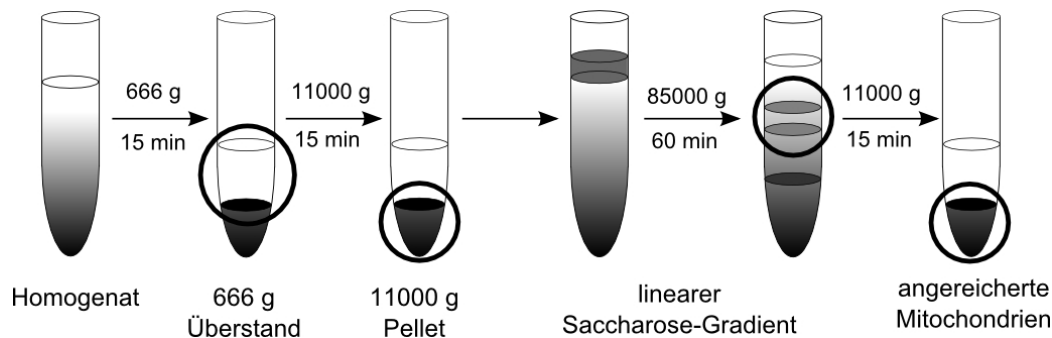
INS-1 Zellen wurden in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro well in 6-well Platten ausgesät und bis zu 60 % Konfluenz kultiviert. Die

Zellen wurden anschließend in Anwesenheit von Glp-1RA in Konzentrationen von 11 bzw. 33 mM Glucose in Wachstumsmedium für 3 Tage gehalten.

### **2.2.6 Isolierung funktioneller Mitochondrien aus INS-1 Zellen**

Für die Präparation von Mitochondrien wurden  $2,5 \times 10^6$  Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 14 cm) ausgesät und unter Standardbedingungen drei Tage bis zur Subkonfluenz kultiviert (2.2.1). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in dem selben Puffer von den Zellkulturschalen geschabt und mittels Zentrifugation (5 min, 800 g, 4°C) pelletiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte im zehnfachen Zellvolumen mittels eines Douncer-Homogenisators in Aufschlusspuffer (2.1.5). Nach dem Entfernen der Zelltrümmer durch Zentrifugation (20 min, 666 g, 4°C) wurde der Überstand erneut pelletiert (20 min, 11000 g, 4°C). Dieses Pellet wurde dann in 2 ml Resuspensions-Puffer (2.1.5) aufgenommen und in einem linearen Saccharosegradienten (0,7 bis 1,5 M in 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) mittels Ultrazentrifugation aufgetrennt (Rotor SW 28, 60 min, 80000 g, 4°C). Durch eine gesättigte Saccharoselösung wurde dieser Gradient in Fraktionen zu je 2 ml ausgetrieben. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an Mitochondrien wurden vereinigt, mit dem 5-fachen Volumen an Resuspensions-Puffer verdünnt und sedimentiert (10 min, 14000 g, 4°C). Der Gehalt an Mitochondrien und weiteren Zellbestandteilen wurde während der Präparation durch die Messung folgender spezifischer Markerenzyme beobachtet (2.3.1): Succinat-Dehydrogenase (Mitochondrien), alkalische Phosphatase (Plasmamembran), Glukose-6-Phosphatase (endoplasmatisches Retikulum), saure Phosphatase (Lysosomen) und Katalase (Peroxisomen).





**Abbildung 2.1: Differentielle Zentrifugation zur Anreicherung funktioneller Mitochondrien.** Nach dem Aufschluss der Zellen wurden die Mitochondrien durch verschiedene Zentrifugationsschritte aufgereinigt. Die markierten Anteile wurden für den jeweils nächsten Schritt verwendet. In den einzelnen Fraktionen wurde der Organellgehalt durch die Messung von Leitenzymen bestimmt.

### 2.2.7 Transfektion von siRNA

Das Einbringen artfremder DNA oder RNA in eukaryotische Zellen bezeichnet man als Transfektion. Übliche Methoden sind hierbei die Calciumphosphat-Transfektion, die Elektroporation oder die Lipofektion. Bei letztgenannter wird DNA bzw. RNA durch Zugabe eines Lipidgemisches in Micellen komplexiert und kann in dieser Form leichter in die Wirtszellen eingeschleust werden.

Die Transfektion von doppelsträngiger siRNA (*small interfering RNA*) dient der gezielten transienten Repression spezifischer Gene (RNA Interferenz). In der Zelle kann die siRNA an einen Nukleasekomplex (*RNA-induced silencing complex*, RISC) binden, wo sie in ihre Einzelstränge aufgetrennt und ihre komplementäre mRNA-Sequenz erkennen kann. Dadurch kommt es zur Spaltung der mRNA etwa 12 Nukleotide abwärts des 3'-Endes der siRNA. Dies führt sukzessive zur Repression der Expression des codierten Proteins.

Doppelsträngige siRNA wurde mithilfe des Transfektionsreagenzes Lipofectamin 2000 in INS-1 Zellen eingebracht. Dazu wurden  $1,2 \times 10^5$  Zellen pro Kavität in 12-Kavitäten-Platten ausgesät und für 24

h in Kulturmedium kultiviert (2.2.1). Pro Ansatz wurde 1  $\mu\text{l}$  Lipofectamin in 125  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium verdünnt und für 5 min inkubiert (RT). In der gleichen Menge Medium wurde auch die siRNA auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Beide Ansätze wurde dann gemischt und für 20 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde ein Mediumwechsel mit 750  $\mu\text{l}$  Kulturmedium ohne Antibiotika und Mercaptoethanol durchgeführt. Zu jeder der zu transfizierenden Kavität wurde ein kompletter Ansatz siRNA-Komplex pipettiert und die Zellen anschließend über Nacht inkubiert (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>), worauf ein Mediumwechsel mit Kulturmedium erfolgte. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert oder weiter bearbeitet.

### **2.2.8 Herstellung von Gesamtzelllysaten**

Für die Proteinanalysen im Western Blot wurden Lysate von INS-1 Zellen hergestellt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit eiskalter PBS gewaschen, auf Eis in Lysispuffer von den Kulturplatten geschabt und in Eppendorfgefäße überführt. Die Proteine wurden durch Inkubation für 2 h bei 4 °C im Überkopfschüttler solubilisiert. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 rpm.

### **2.2.9 Messung von intrazellulären cAMP-Spiegeln**

Für die Bestimmung der intrazellulären cAMP-Spiegel wurden je 10<sup>6</sup> Zellen in Petrischalen (10 cm Durchmesser) ausgesät und für 4 Tage kultiviert. Am Versuchstag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit cAMP-Stimulationspuffer versetzt. Vor der eigentlichen Stimulation mit Glp-1-Mimetika wurden die Zellen mit 200  $\mu\text{M}$  Isobutylmethylxanthin (IBMX) vorinkubiert, um einen Abbau des gebildeten cAMP durch die Phosphodiesterase (PDE) zu inhibieren. Die Stimulation mit Glp-1-Mimetika erfolgte dann für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Das Medium wurde daraufhin

entfernt und die Zellen in 500  $\mu$ l Lysispuffer (100 mM HCl, 0,1 % Triton-X 100) lysiert. Die Proben wurden bei -80 °C eingefroren und am Messtag wieder aufgetaut, um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm entfernt. Die Messung der cAMP-Konzentrationen erfolgte über den cyclic AMP (low PH) Immunoassay (RD Systems) nach Herstellerprotokoll.

### **2.2.10 Messung von Insulinsekretion**

Um die Funktionalität der Glp-1-Mimetika und die der INS-1 Zellen zu testen, wurden Insulinsekretionsmessungen durchgeführt. Hierzu wurden je 3 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Kavität in eine 6-Kavitäten-Zellkulturplatte ausgesät und für drei Tage kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen über Nacht in Kulturmedium mit verringerter Glukosekonzentration (5,5 mM) gehalten. Am Tag der Stimulation wurden die Zellen zweimal in Krebs-Ringer-Lösung (KRBH) gewaschen und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in dieser inkubiert. Die eigentliche Stimulation erfolgte für 30 min in KRBH. Zur Insulinbestimmung wurde der Puffer abgenommen und der Insulingehalt mit dem Ultrasensitive Rat Insulin ELISA nach Herstellerangaben bestimmt. Die Zellen wurden anschließend lysiert und der Proteingehalt gemessen.

### **2.2.11 Detektion von Apoptose**

#### **Enzymatische Messung der Caspase 3-Aktivität**

Die Messung der enzymatischen Aktivität der Effektor-Caspase 3 diente als ein relatives Maß für die Apoptose. Hierzu wurde Ac-DEVD-AMC, ein an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltes Tetrapeptid, als ein spezifisches Substrat verwendet. In den jeweiligen Zelllysaten wurde die relative enzymatische Caspase 3-Aktivität als Endpunktmessung nach Herstellerangaben gemessen. Dazu wurden die Zellen zunächst in 200  $\mu$ l Caspase-Lysispuffer (2.1.5) ly-

siert und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (13000 rpm, 4°C, 20 min) abgetrennt. Für die Messung wurden je 50  $\mu$ l Probe zu 150  $\mu$ l Caspase-Assaypuffer (2.1.5) in Fluoreszenz-Mikrotiterplatten pipettiert und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgte darauf im Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm. Die gemessenen Werte wurden auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe normiert.

### **Fluoreszenzfärbung**

Die Aktivierung von DNAsen im späteren Verlauf der Apoptose führt zu einer Kondensation und Fragmentierung der Zellkerne. Dies lässt sich über eine Kernfärbung nachweisen. Dazu wurden entsprechend stimulierte Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Färbelösung (10  $\mu$ g/ml Hoe33342, 1  $\mu$ g/ml Propidiumjodid) überschichtet und für 15 min bei 37°C inkubiert. Dabei dringt der Farbstoff Hoe33342 in alle Zellen ein und färbt so die Kerne aller Zellen an, wogegen PI nur in nekrotische Zellen bzw. Zellen in sekundärer Apoptose eindringt. Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und anschließend im Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Hierbei sind alle Zellkerne durch Hoe33342 angefärbt. Gesunde Zellen sind nur Hoe33342-gefärbt und haben einen intakten Zellkern. Nekrotische Zellen erscheinen mit PI-gefärbtem, intakten bis leicht vergrößertem Zellkern. Apoptotische Zellen haben einen fragmentierten Zellkern, der entweder nur Hoe33342-gefärbt ist (primäre Apoptose) oder zusätzlich durch PI gefärbt wird (sekundäre Apoptose). Von den so angefärbten Zellen wurden je drei Sichtfelder zufällig ausgewählt, digital fotografiert und mit einer Bildanalysesoftware ausgewertet (ImageJ, NucleoCounter). Auf diese Weise wurden pro Ansatz mindestens 500 Zellen ausgezählt.

### 2.2.12 Messung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Messung intrazellulär gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies erfolgte mittels des Fluoreszenzfarbstoffs 5-(und 6-)chloromethyl-2'7'-dichlorohydrofluorescein-diacetat (CM-H<sub>2</sub> DCFDA, DCF). Dieser zellgängige Farbstoff wird intrazellulär durch Esterasen gespalten und durch ROS oxidiert, wodurch er fluoreszent wird. Die detektierte Fluoreszenz dient dann als Maß der gebildeten ROS. INS-1 Zellen wurden entweder mit Cytokinen oder hoher Glukose in An- bzw. Abwesenheit von Glp-1RA behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 30 min mit 1  $\mu\text{mol/l}$  DCF beladen. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 280  $\mu\text{l}$  DCF-Lysispuffer lysiert. Die Fluoreszenz wurde in je 100  $\mu\text{l}$  Lysat als Duplikat in einem FluoStar-P Fluorimeter gemessen. Angeregt wurde dabei mit Licht der Wellenlänge 485 nm, das emittierte Licht wurde bei 530 nm gemessen. Die resultierenden Messwerte wurden auf den Proteingehalt der jeweiligen Proben normiert.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

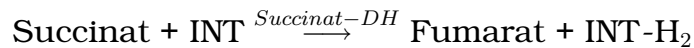
### 2.3.1 Enzymaktivitätsmessungen

Während der subzellulären Fraktionierung von INS-1 Zellen (2.2.6) wurde der Gehalt an Mitochondrien und anderen Organellen über die Messung der Aktivität ihrer jeweiligen Leitenzyme bestimmt. Aus diesen Werten wurden auch die Anreicherungen und die Ausbeuten der Organellen berechnet.

#### **Succinat-Dehydrogenase (Mitochondrien)**

Die Succinat-Dehydrogenase oxidiert in der Zelle Succinat zu Fumarat, wobei sie Elektronen auf den Akzeptor FAD (Flavin Adenin Dinukleotid) überträgt und somit reduziert. Zur Aktivitätsmessung wurde stattdessen INT (p-Jodnitrotetrazoliumviolett) als Elektronenakzeptor verwendet, der in seiner reduzierten Form eine kar-

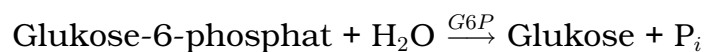
minrote Farbe aufweist.



Für die Messung wurden je 20  $\mu\text{l}$  Probe mit 300  $\mu\text{l}$  Natriumsuccinat-Lösung (10 mM in  $\text{H}_2\text{O}$ ) gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Eine weitere zehnminütige Inkubation erfolgte nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  INT-Lösung (2,5 mg/ml in 50 mM Natriumdihydrogenphosphat in  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,5). Anschließend wurde die Reaktion mit 1 ml Stopplösung (Ethylacetat:Ethanol:TCA 5:5:1, (v/v/w)) abgestoppt und abzentrifugiert (2 min, 14000 rpm). Die jeweilige Extinktion bei 490 nm wurde photometrisch gemessen und diente zur Berechnung der Aktivität der Succinat-Dehydrogenase (Extinktionskoeffizient für INT = 0,0134 ml/ $\mu\text{mol}$  x cm). Zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt (2.3.2).

### **Glukose-6-Phosphatase (ER)**

Die Glukose-6-phosphatase (G6P) ist ein Enzym der Glukoneogenese und dient der Dephosphorylierung von Glukose-6-phosphat, wodurch diese mittels Glukosetransportern aus der Zelle transportiert werden kann. Sie ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und diente deshalb bei der Zellfraktionierung als Leitenzym des ER. Die Aktivität der Glukose-6-Phosphatase wurde über die Bildung von freiem Orthophosphat ( $\text{P}_i$ ) nach Fiske und Subbarow [216] gemessen.

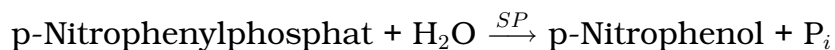


Für die Reaktion wurde 100  $\mu\text{l}$  Probe zum Reaktionspuffer (100  $\mu\text{l}$  1 mM Natriumcacodylat pH 7,2, 100  $\mu\text{l}$  250 mM Saccharose / 100 mM EDTA pH 7,2, 100  $\mu\text{l}$  100 mM Glukose-6-phosphat, alles gelöst in  $\text{H}_2\text{O}$ ) pipettiert, gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1,5 ml TCA (0,8 % (w/v) in  $\text{H}_2\text{O}$ ) abgestoppt und der Ansatz abzentrifugiert (10 min, 3000

rpm). Um freies Phosphat der Probe in der Messung zu berücksichtigen, wurde für jede Probe ein Leerwert bestimmt, bei dem das Substrat durch H<sub>2</sub>O ersetzt wurde. Für die Bestimmung von freiem Phosphat wurde 1 ml des jeweiligen Reaktionsüberstands mit 1 ml Fiske-Reagenz (2.1.5) gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 815 nm bestimmt. Zur Berechnung der Phosphatkonzentrationen wurde eine Standardverdünnungsreihe mit Kaliumdihydrogenphosphat (200 mM in H<sub>2</sub>O) als Standard hergestellt.

### **Saure Phosphatase (Lysosomen)**

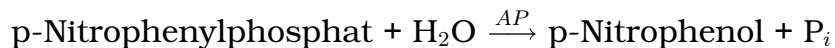
Die saure Phosphatase hat ein pH-Optimum von 4-5, kommt in Lysosomen als Leitenzym vor und dephosphoryliert Verbindungen mit hohem Phosphatübertragungspotential. Zur Bestimmung der Phosphataseaktivität wurde hier p-Nitrophenylphosphat als Phosphatdonor eingesetzt. Dieses wird zu p-Nitrophenol dephosphoryliert, welches im alkalischen pH in ein gelb gefärbtes Nitrophenolat-Anion umgewandelt wird.



Für den Test wurden je 25  $\mu\text{l}$  Probe mit 200  $\mu\text{l}$  Substratlösung (90 mM Natriumacetat pH 5,0, 8 mM p-Nitrophenylphosphat in H<sub>2</sub>O) gemischt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 600  $\mu\text{l}$  250 mM NaOH wurde die Reaktion abgestoppt und der Ansatz anschließend abzentrifugiert (2 min, 14000 rpm). Die Messung der Extinktion erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 410 nm (Extinktionskoeffizient für Nitrophenolat: 0,521 ml/ $\mu\text{mol}$  x cm). Zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt (2.3.2).

### **Alkalische Phosphatase (Plasmamembran)**

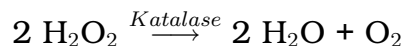
Im Gegensatz zur sauren Phosphatase arbeitet die alkalische Phosphatase ihrem Namen nach bei einem alkalischen pH-Wert. Als Phosphatdonor wurde hier ebenfalls p-Nitrophenylphosphat eingesetzt, die Reaktion erfolgte allerdings bei pH 9,8.



Für den Test wurde 25  $\mu\text{l}$  Probe mit 200  $\mu\text{l}$  Substratlösung (125 mM Natriumborat pH 9,8, 8 mM p-Nitrophenylphosphat in  $\text{H}_2\text{O}$ ) gemischt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600  $\mu\text{l}$  250 mM NaOH abgestoppt und der Ansatz abzentrifugiert (2 min, 14000 rpm). Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 410 nm im Photometer. Zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt (2.3.2).

### **Katalase (Peroxisomen)**

Die Katalase führt in der Zelle eine Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser durch und ist vorwiegend in Peroxisomen lokalisiert.



Bei diesem Test dient die Abnahme der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration als Maß für die Aktivität der Katalase. Zusammen mit Titiandioxid bildet  $\text{H}_2\text{O}_2$  einen gelbfarbigen Komplex und kann so photometrisch bestimmt werden. Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  Probe mit 30  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,0 mit 0,1 % BSA (w/v) / 2 % (v/v) Triton X-100, Verhältnis 2:1 in  $\text{H}_2\text{O}$ ) versetzt. Zu diesem Ansatz wurde 500  $\mu\text{l}$  Reaktionpuffer (8,5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in 20 mM Tris/HCl pH 7,0 mit 0,1 % BSA (w/v) in  $\text{H}_2\text{O}$ ) gegeben, gemischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Danach wurde zu diesem Ansatz 1 ml Titanoxidsulfat (2,25 g/l in 1 M Schwefelsäure) gegeben, gemischt und der Ansatz abzentrifugiert (5 min, 14000 rpm). Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm im Photometer.



### 2.3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde colorimetrisch nach der Methode von Bradford [217] bestimmt. Hierzu wurde der BioRad Proteinassay verwendet. Je 10  $\mu\text{l}$  Probe wurden mit 190  $\mu\text{l}$  Reagenz gemischt, 30 min inkubiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer bestimmt. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA verwendet.

### 2.3.3 Eindimensionale gelelektrophoretische Proteinauftrennung

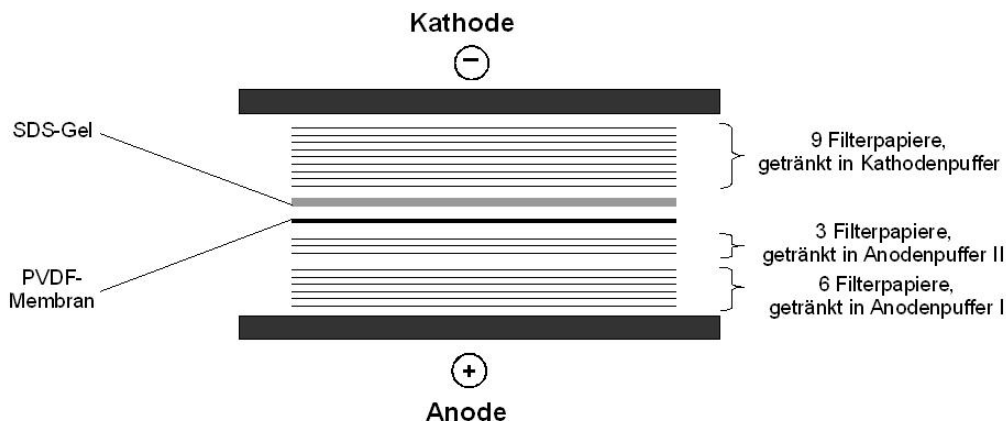
Die jeweiligen Zellextrakte wurden mit Laemmli-Puffer gemischt, für 10 min bei 95°C inkubiert und in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gel mittels horizontaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 2.1 dargestellt. Als Proteinstandard wurde der Prestained Protein Marker verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA durchgeführt.

Komponente	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
30% Acrylamidlg.	4,9 ml	1,14 ml
1,5 mol/l Tris pH 8,8	3,75 ml	-
0,5 mol/l Tris pH 6,8	-	0,91 ml
H <sub>2</sub> O <i>bideest.</i>	6,2 ml	4,81 ml
10 % SDS	150 $\mu\text{l}$	70 $\mu\text{l}$
10 % Ammoniumpersulfat	150 $\mu\text{l}$	70 $\mu\text{l}$
TEMED	15 $\mu\text{l}$	7 $\mu\text{l}$

**Tabelle 2.1: Zusammensetzung der SDS-Gele.**

### 2.3.4 Proteintransfer auf Membranen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mittels Blottransfer auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen transferiert. Das diskontinuierliche Puffersystem bestand aus drei Pufferlösungen. Das Gel wurde zunächst in Anodenpuffer II inkubiert und von seiner Trägerfolie gelöst. Die Membran wurde kurz in Methanol aktiviert und ebenfalls in Anodenpuffer II inkubiert. Zusammen mit dem Gel und mit puffergetränkten Filterpapieren (10 x 25 cm) wurde der Blot in folgender Reihenfolge aufgebaut: Anode - 6x Filterpapier in Anodenpuffer I - 3x Filterpapier in Anodenpuffer II - Membran - Gel - 9x Filterpapier in Kathodenpuffer - Kathode (Abb. 2.2). Der Elektrotransfer wurde mit einer konstanten Stromstärke von 150 mA für 133 mAh durchgeführt.



**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Western Blot nach dem Semi-Dry-Verfahren.**

### 2.3.5 Immundetektion

Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Membranen nach dem Proteintransfer für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer (TBST + 5 % Magermilchpul-

ver bzw. TBST + 5 % BSA) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (TBS/Tween 0,1 %) erfolgte die Inkubation mit dem gewünschten spezifischen Antikörper in Blockierungspuffer bei 6°C über Nacht. Die Membranen wurden daraufhin erneut mehrmals gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in geeigneter Verdünnung in Blockierungspuffer inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift konnten die Proteinbanden mittels einer ECL (enhanced chemiluminescence) - Reaktion detektiert werden. Dazu wurden die Membranen in ECL-Reagenz für 1 min inkubiert und die Signale in einem LumiImager detektiert und quantifiziert. Dazu wurde die Software Lumi Analyst verwendet.

### **2.3.6 Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE)**

Die präparierten Mitochondrien wurden zunächst in Mitochondrien-Lysispuffer (2.1.5) lysiert und auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml verdünnt. Nach einer kurzen Ultraschallbehandlung wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernt (40 min, 40000 g, 4°C). Anschließend wurden die jeweiligen Mitochondrienpräparationen mit fluoreszierenden Cyanin-Farbstoffen nach den Angaben des Herstellers markiert. Dazu wurden je 50 µg pro Gel der zu vergleichenden Proben mit 400 pmol Farbstoff (Cy3 oder Cy5) versetzt. Ein Gemisch aus allen vier Proben (je 12,5 µg pro Gel) wurde zusätzlich mit Cy2 markiert und diente als interner Standard. Zur Berücksichtigung farbstoffspezifischer Unterschiede wurden die Proben für die einzelnen Gele kreuzweise entweder mit Cy3 oder Cy5 angefärbt. Vor der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wurden die Proben mit demselben Volumen (25 µl) Mitochondrien-Lysispuffer mit 2 % (w/v) DTT und 2 % (v/v) IPG-Puffer (2.1.2) versetzt. Anschließend wurden sie vereinigt und für die IEF auf Polyacrylamid-Gelstreifen mit einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG-Streifen) aufgetragen, die zuvor in IPG-Rehydra-

tionspuffer (2.1.5), versetzt mit 0,5 % des entsprechenden IPG-Puffers, über Nacht rehydriert wurden. Dabei wurden die Proben auf der Seite des niedrigen pH-Wertes aufgetragen. Die IEF wurde mit einer MultiPhor II Elektrophoreseapparatur unter den Bedingungen laut Tab. 2.2 durchgeführt.

pH 4-7	pH 7-9
3 h 300 V	5 h 300 V
Gradient 10 V/min bis 3500 V	
21 h 3500 V	9 h 3500V

**Tabelle 2.2: Phasen der isoelektrischen Fokussierung.**

Vor der Auftrennung in der zweiten Dimension wurden die IPG-Streifen zunächst für 15 min in IPG-Equilibrierungspuffer (2.1.5) mit 0,5 % (w/v) DTT, danach für weitere 15 min im selben Puffer equilibriert, allerdings unter Zusatz von 4,5 % (w/v) Jodacetamid statt DTT. Die Auftrennung nach molekularer Größe erfolgte mittels SDS-PAGE in 12,5-prozentigen Gelen in einer EttanDalt twelve Elektrophoreseapparatur, wobei je 12 Gele gleichzeitig bearbeitet werden konnten.

### 2.3.7 Bildanalyse

Die Gele wurden direkt zwischen ihren Glasplatten mittels eines Typhoon 9400 Laserscanners nach den Empfehlungen des Herstellers ausgelesen. Die Bestimmung der Abundanzen der einzelnen Proteinspots wurde mit der Proteomweaver 4.0 Bildanalyse-Software erstellt. Dazu wurden jeweils Gele mit gleichen Proben miteinander verglichen. Proteinspots wurden als unterschiedlich in ihrer Abundanz definiert, wenn sie in allen analysierten Gelen nachweisbar waren und sich die entsprechenden Werte zwischen den jeweiligen Behandlungsbedingungen um mindestens den Faktor 1,5 voneinander unterschieden.

### 2.3.8 Identifikation von Proteinen mittels MALDI-MS

Um die Proteinspots aus den Cyanin-gefärbten Gelen auszuschneiden, wurden diese zuvor mit einem Ruthenium-Fluoreszenzfarbstoff angefärbt [218]. Die nachgefärbten Gele wurden anschließend durch die Proteomweaver-Software mit ihren entsprechenden Fluoreszenzbildern abgeglichen, und die zu analysierenden Proteinspots mit einem Gelpix spot picker aus den 2D-Gelen ausgeschnitten und in eine 96-well-Platte überführt. Vor der massenspektrometrischen (MS) Analyse wurden die Stücke (Durchmesser 2 mm) für je dreimal 10 Minuten abwechselnd in Verdauungspuffer (2.1.5) und Verdauungspuffer/Acetonitril (1:1) gewaschen. Nach ihrer Trocknung wurden die Gelstücke mit 5  $\mu$ l Verdauungspuffer versetzt mit 10 ng/ml Trypsin für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine verdaut (37°C, 4 h) und die entstandenen Peptide mit 10  $\mu$ l 1 %-iger Trifluoressigsäure (TFA) bei Raumtemperatur für 60 Minuten eluiert. Jeweils 4  $\mu$ l der extrahierten Peptide wurden auf ein AnchorChip Target mit Kalibrations-Standards aufgetragen. Nach einer Inkubation von 30 Sekunden wurde 4  $\mu$ l Waschpuffer (10 mM Ammoniumphosphat, 0,1 % (w/v) TFA in H<sub>2</sub>O) zugegeben und die Probe mitsamt Puffer quantitativ entfernt. Die Proben wurden automatisch in einem Ultraflex-/TOF/TOF Massenspektrometer mit Reflektor und verzögerter Extraktion analysiert. Die erhaltenen Massenspektren wurden automatisch mittels der Compass Software (Bruker Daltonics, Bremen, Version 1.1) kalibriert. Die Identifikation der Proteine erfolgte über *peptide mass fingerprinting* (PMF) mit der Software Biotools (Bruker Daltonics, Version 3.0). Die Datenbanken von Swiss-Prot (Sprot 49.2) und NCBI (NCBINr\_20060928) wurden mit diesen MS-Spektren mittels der Mascot Suchmaschine (Matrix Science, London, Version 1.9) durchsucht.

Zur Bestätigung wurde jeder Proteinspot aus sechs unterschiedlichen Gelen analysiert. Ein Protein galt dann als identifiziert, wenn

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

es in mindestens drei dieser Gele gefunden wurde.

## 3 ERGEBNISSE

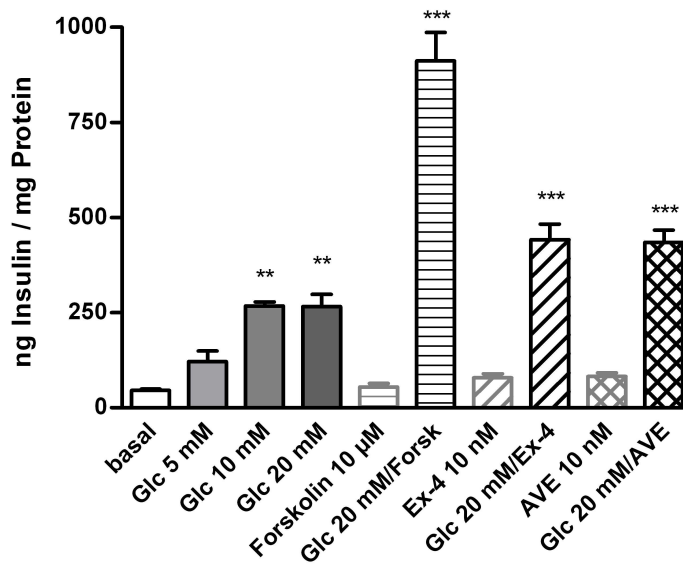
### 3.1 Stimulation der Glukose-induzierten Insulinsekretion

Um die Funktionalität der verwendeten Zellen und Glp-1RA zu testen, wurde die Glukose-stimulierte Insulinsekretion unter Anwesenheit von je 10 nM GLP-1RA bestimmt (2.2.10). Als Positivkontrolle diente Forskolin, ein Aktivator der Adenylatcyklase. Die Stimulation wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten gemessen.

Glukose allein stimulierte die Insulinsekretion bis zu einem Maximum von etwa 6-fach verglichen mit dem Basalwert, bei einer Konzentration von 10 mM. Für die Kombinationen mit Glp-1RA wurden 20 mM Glukose verwendet. Sowohl die Glp-1RA als auch Forskolin konnten die Insulinsekretion alleine nicht stimulieren. Zusammen mit Glukose erreichten die Glp-1-Mimetika das zehnfache des Basalwertes, in Kombination mit Forskolin wurde die Insulinsekretion 20-fach stimuliert (Abb. 3.1).

### 3.2 Induktion von Apoptose durch verschiedene Stimuli

Beim Diabetes mellitus Typ 2 sind die Betazellen des Pankreas verschiedenen Stressoren wie freien Fettsäuren, hohen Glukosekonzentrationen und Zytokinen, ausgesetzt. Um die Apoptose unter diesen Bedingungen am vorliegenden Zellmodell näher zu untersuchen, wurden INS-1 Zellen mit eben diesen Stressoren unter An- bzw. Abwesenheit von Glp-1RA behandelt.



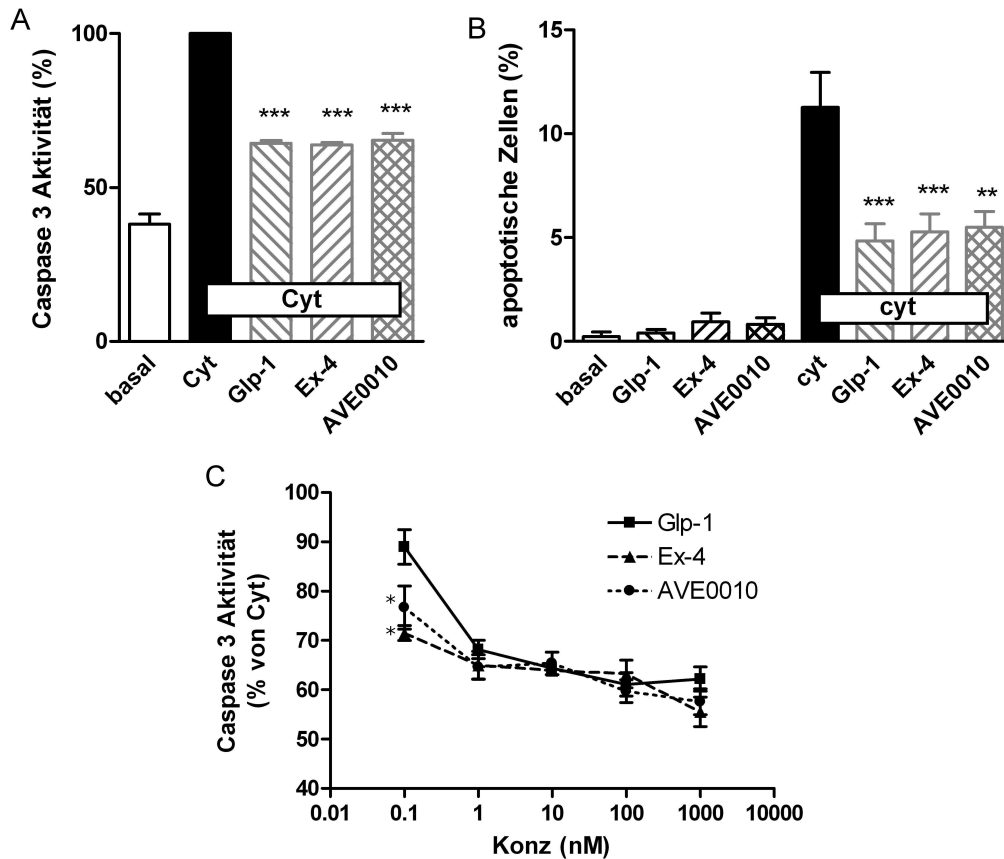
**Abbildung 3.1: Insulinsekretion.** INS-1 Zellen wurden für einen Tag in 5,5 mM Glukose kultiviert und danach für 1 h in Puffer ohne Glukose inkubiert. Die Stimulation erfolgte für 30 min mit den angegebenen Konzentrationen mit Glukose (Glc), Forskolin (Forsk), Exendin-4 und AVE0010 (AVE). Die Messung von Insulin erfolgte mit dem Ultrasensitive Rat Insulin ELISA nach Herstellerangaben. Die Werte aus vier unabhängigen Experimenten sind auf den Proteingehalt der Proben normiert und sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.2.1 Induktion durch Zytokine

Die Behandlung der Zellen mit einem Zytokingemisch aus IL-1 $\beta$  und Interferon- $\gamma$  steigerte die Caspase 3-Aktivität auf das 2,6-fache des Basalwertes und die Anzahl apoptotischer Zellen auf 11,3 % der Gesamtzellen. Es konnte keine Nekrose durch diese Behandlung gemessen werden. Die gleichzeitige Inkubation mit Glp-1RA reduzierte die Apoptose jeweils um etwa 60 %. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Glp-1RA bei Einsatz von hohen Konzentrationen. Lediglich bei Konzentrationen von 100 pmol/l waren Exendin-4 und AVE0010 dem natür-



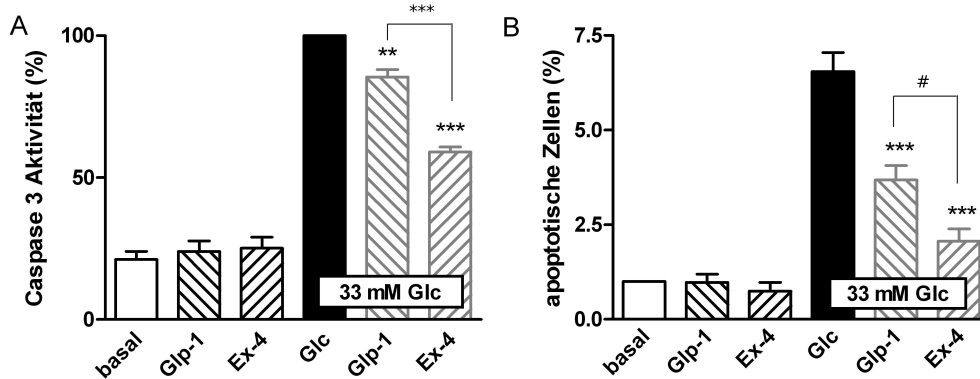
lichen Glp-1 überlegen. (Abb. 3.2)



**Abbildung 3.2: Inhibition von Zytokin-induzierter Apoptose durch Glp-1RA.** Nach einer Vorinkubation mit Glp-1 Rezeptoragonisten (A und B: 10 nM, C: 0,1 bis 1000 nM) für 5h wurden die Zellen einem Zytokincocktail (4 ng/ml IL- $\beta$ , 1 ng/ml IFN- $\gamma$ ) ausgesetzt. Die Messung der Apoptose erfolgte über die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität in Zellysaten (A,C) oder über die Messung der Kerfragmentation (B). Die Daten stammen aus 6 unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001

### 3.2.2 Induktion durch hohe Glukosespiegel

Hier wurden die Zellen für drei Tage bei einer hohen Glukosekonzentration (33 mM) gehalten. Als basale Kontrolle diente hier die Standard-Glukosekonzentration des INS-1 Wachstumsmediums von 11 mM. Hohe Glukosespiegel induzierten hier die relative Caspase 3-Aktivität um das 4,7-fache des Basalwertes und die Anzahl der kondensierten apoptotischen Zellkerne auf 6,7 %, ohne Nekrose zu induzieren. Glp-1 und Exendin-4 inhibierten unter diesen Bedingungen Apoptose, wobei der Effekt von Exendin-4 auf Ebene der Caspase 3-Aktivität signifikant stärker war. Auf Ebene der Kernfragmentation war dieser Unterschied allerdings nicht festzustellen (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3: Inhibition von Glukose-induzierter Apoptose durch Glp-1RA.** INS-1 Zellen wurden unter Standardbedingungen (11 mM Glukose) oder mit hohen Glukosekonzentrationen (33 mM) in Anwesenheit von je 10 nM Glp-1RA kultiviert. Die Bestimmung von Apoptose erfolgte entweder über die Messung der Caspase 3- Aktivität (A) oder der Kernfragmentation (B). Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt, \*\*/\*\* signifikant unterschiedlich zum Zytokinwert bzw. signif. Unterschied zwischen markierten Werten, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0,001. ‡ nicht sigifikant unterschiedlich.

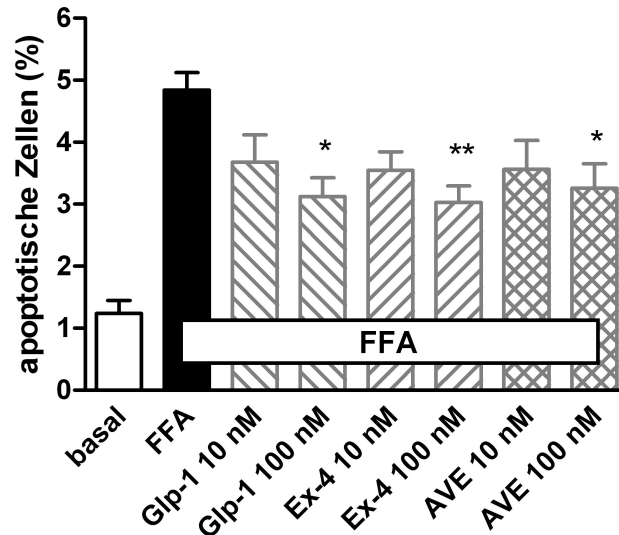
### **3.2.3 Induktion durch freie Fettsäuren**

Bei diesen Experimenten wurden INS-1 Zellen Palmitinsäure (gekoppelt an BSA) ausgesetzt. Um den synergistischen Effekt von Glukose auf die Betazellapoptose zu minimieren, wurden die Versuche bei einer niedrigen Glukosekonzentration durchgeführt. Freie Fettsäuren erhöhten hier die Anzahl von apoptotischen Kernen von 1,2 % um das 4-fache auf 4,8 % der Gesamtzellzahl. Auch hier wurden keine nekrotischen Ereignisse festgestellt. Glp-1RA reduzierten in einer Konzentration von 100 nM die Apoptose unter diesen Bedingungen um 40-50 %, bei geringerer Konzentration (10 nM) konnte allerdings keine signifikante anti-apoptotische Wirkung festgestellt werden. (Abb. 3.4)

Es konnte demnach gezeigt werden, dass alle Glp-1-Mimetika in dem gewählten Zellsystem eine inhibitorische Wirkung auf verschiedene apoptotische Stimuli ausüben. Im Folgenden sollte die Wirkung von Exendin-4 auf das Proteom isolierter Mitochondrien unter apoptotischen Bedingungen näher untersucht werden, um mögliche neue Wirkmechanismen dieses Glp-1-Mimetikums aufzudecken.

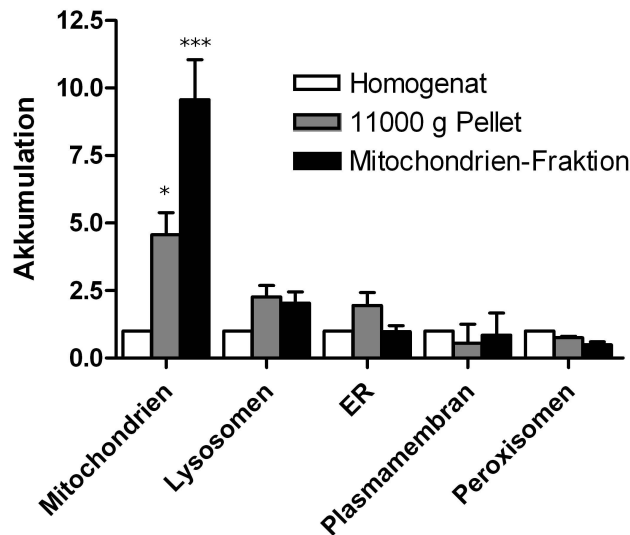
## **3.3 Präparation funktioneller Mitochondrien**

Um Veränderungen in den Proteinmustern durch Zytokin-induzierte Apoptose und ihre Inhibition durch Exendin-4 aufzuklären, wurde ein Protokoll zur Aufreinigung funktioneller Mitochondrien etabliert (nach [219], modifiziert). Dazu wurden die Zellen mit Zytokinen und Exendin-4 wie beschrieben behandelt und direkt für die Organellaufbereitung verwendet. Um die Probenzusammensetzung und die Verteilung der Organellen während der Aufreinigung bestimmen zu können, wurden Enzymtests durchgeführt. Durch die Messung der Succinat-Dehydrogenase - dem Markerenzym für Mitochondrien - wurden funktionelle Mitochondrien in den Frak-



**Abbildung 3.4: Inhibition von FFA-induzierter Apoptose durch Glp-1RA.** INS-1 Zellen wurden für 18 h in fettsäurehaltigem (500  $\mu$ M Palmitinsäure an BSA, Verhältnis 3:1) Hungermedium in Anwesenheit von Glp-1RA kultiviert. Als Negativkontrolle diente entsprechend Hungermedium mit der gleichen BSA-Konzentration. Apoptose wurde durch die Messung von fragmentierten Zellkernen bestimmt. Die Daten stammen aus fünf unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

tionen des Saccharose-Dichtegradienten zwischen 34 und 38 % Saccharose gemessen. Die berechnete Ausbeute betrug dabei 42,1 %. Die Verunreinigung der Mitochondrienfraktion durch andere Organellen wurde durch die Messung der entsprechenden Markerenzyme bestimmt. Verglichen mit der Ausgangsaktivität konnten Mitochondrien um den Faktor 10 angereichert werden (Abb. 3.5). Dadurch konnten funktionelle Mitochondrienfraktionen mit mehr als 60 % Mitochondrien für die vergleichende quantitative Analyse der Proteinmuster verwendet werden, um eine detaillierte Untersuchung des Organellen-Subproteoms durchzuführen.



**Abbildung 3.5: Anreicherung von Organellen während der subzellulären Fraktionierung.** Für die Präparation der Mitochondrien wurden die Zellen wie in 2.2.6 beschrieben behandelt. Die Organell-Zusammensetzung wurde nach jedem Präparationsschritt durch die Messung des jeweiligen Leitenzyms bestimmt. Aus ihren Aktivitäten wurden die Anreicherungsfaktoren bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 14 Aufreinigungen. \*/\*\*\* signifikant unterschiedlich zum Homogenat, \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.4 Vergleichende, quantitative Analyse verschiedener mitochondrialer Proteinmuster durch 2D-DIGE

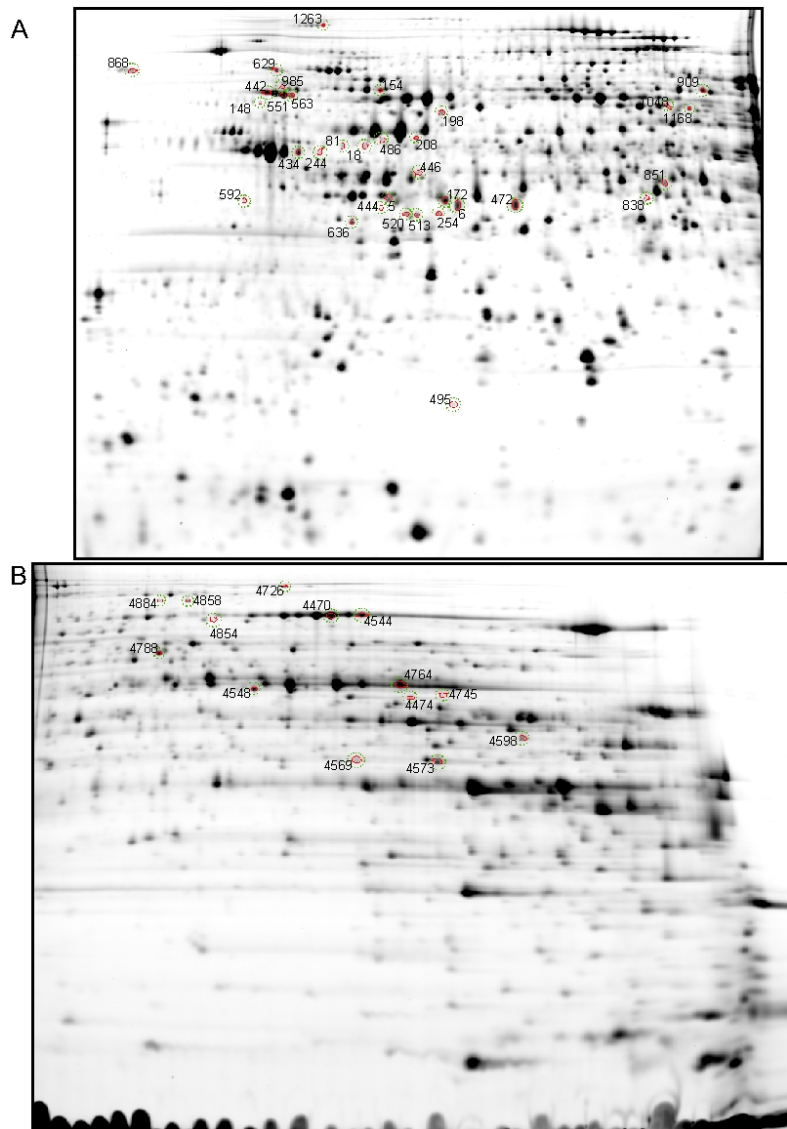
Für die quantitative Analyse der mitochondrialen Proteinmuster wurde die zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (*two-dimensional difference gel electrophoresis*, 2D-DIGE) verwendet. Dazu wurden 0,5 mg der Proteinproben gelöst und vor der elektrophoretischen Auftrennung mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3/Cy5) markiert. Um potentielle Fehler bei der Proteinmarkierung aus-

zuschließen, wurden die Proben wechselseitig sowohl mit Cy3 als auch mit Cy5 gefärbt. Zur Generierung eines internen Standards wurden gleiche Mengen jeder Probe gemischt und mit Cy2 gefärbt. Gleiche Mengen der entsprechend markierten Proben wurden gemischt (150  $\mu\text{g}/\text{Gel}$ ) und auf 2D-Gelen über die pH-Bereiche 4-7 und 6-9 aufgetrennt (Abb. 3.6). Um die Proteinmuster zu untersuchen, wurden die Gele mit den entsprechenden fluorophorspezifischen Anregungs- und Emissionswellenlängen detektiert, wodurch sich drei unabhängige Bilder ergaben, jedes spezifisch für die entsprechende Cy-markierte Probe. Die Bildanalyse wurde automatisch mit der Proteomweaver Software (Version 4.0) durchgeführt. Nur diejenigen Proteinspots wurden ausgewählt, die in allen analysierten Gelen vorhanden und Unterschiede hinsichtlich ihrer Abundanz größer als einen Faktor 1,5 aufwiesen. Über alle Gele wurden 2015 Proteinspots im pH-Bereich zwischen 4 bis 9 detektiert. Davon waren 142 Spots der mitochondrialen Proteinprofile signifikant verändert.

### **3.5 Identifikation der unterschiedlich exprimierten Proteinspots**

Diese 142 Proteinspots wurden zur Identifikation aus den Gelen ausgeschnitten, mit Trypsin im Gel verdaut und die resultierenden Peptide anschließend einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Durch eine Suche in der Swiss-Prot Datenbank konnten insgesamt 51 Proteinspots identifiziert werden (markiert in Abb. 3.6). Diese konnten insgesamt 36 Proteinen zugeordnet werden, 13 davon konnten aufgrund ihrer Annotation in der Datenbank Mitochondrien zugeordnet werden. (Tab. 3.1).

27,8 % der identifizierten Proteine konnten in mehr als einem Spot nachgewiesen werden, vermutlich aufgrund post-translationaler Modifikationen (PTM) wie Phosphorylierungen, Acetylierungen oder Ribosylierungen.



**Abbildung 3.6: Mitochondriales Proteinmuster aus INS-1 Zellen.** Typisches 2D-Proteinmuster von aufgereinigten Mitochondrien aus INS-1 Zellen. Die Proben wurden auf IPG-Streifen über die pH-Bereiche 4-7 (A) und 6-9 (B) aufgetrennt. Durch die automatisierte Analyse durch Proteomweaver konnte 2015 Proteinspots aus allen replizierten Gelen detektiert und verglichen werden. Die markierten Spots wurden durch MALDI-TOF-TOF-Analysen identifiziert (Tab. 3.1).

Beispielsweise wurde ein Hitzeschockprotein aus dem ER, das *glucose regulated protein 78* (Grp78/BiP) in vier nebeneinander gelegenen Spots gefunden. Der im sauren Teil des Gels gelegene Spot (Nr. 442) war durch Zytokin-Behandlung signifikant in seiner Abundanz verstärkt (Faktor 1,53), die anderen drei Spots (551, 563 und 985) wurden dagegen reprimiert. Durch die Behandlung mit Exendin-4 waren die Spots, verglichen mit den Zytokinwerten, leicht, aber signifikant stärker. Ein Vorläuferprotein der lysosomalen Protease Cathepsin D wurde ebenfalls reguliert und wurde in fünf Spots identifiziert. Vier davon (5, 172, 472 und 902) waren signifikant niedriger durch die Zytokin-Behandlung. Die Aktivierung von Procathepsin (52 kDa) wird durch eine Spaltung in eine intermediäre Form (48 kDa) und weiter in das reife doppelkettige Enzym erreicht (14 und 34 kDa). Die detektierten Spots lagen bei einer molekularen Masse von etwa 50 kDa.

Die mitochondriale Aconitase wurde in drei Spots identifiziert, zwei davon (4544 und 4470) wurden durch die Behandlung mit Zytokinen herunterreguliert.

Viele der identifizierten Proteinspots gehören zur mitochondrialen Elektronentransportkette. Das NADH Dehydrogenase (Ubiquinon) Fe-S Protein 1 ist Teil von Komplex I und wurde durch Zytokine signifikant in seiner Abundanz verringert (Nr. 154). Die Succinat-Dehydrogenase (Ubiquinon) Flavoprotein Untereinheit, die Teil des Komplexes II der Atmungskette ist, war durch Zytokine reprimiert in Spot Nr. 1168 und induziert in Spot Nr. 1048, was auf eine Verschiebung durch PTM hinweisen könnte. Das Ubiquinol-Cytochrom c Reduktase Kernprotein 1 ist Teil vom Komplex III und wurde durch Zytokine reprimiert (Nr. 446, Faktor 0,6). In der Kombination mit Exendin-4 war dieser Effekt verglichen mit der alleinigen Behandlung mit Exendin-4 komplett aufgehoben. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der  $F_o$ -Domäne der ATP-Synthase (Komplex V) wurden in zwei Spots identifiziert (Nr. 4764 und 434) und wurden beide durch Zytokin-Behandlung herunterreguliert. Durch die Kombination der Zytokine mit Exendin-4 wurde dieser Effekt zumindest bei



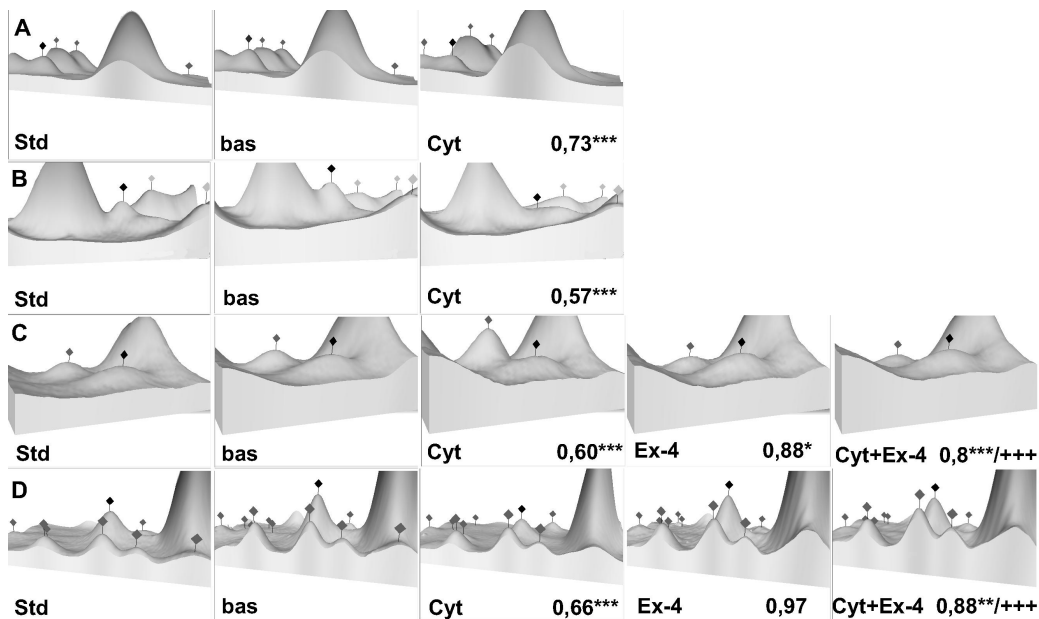
der  $\beta$ -Untereinheit signifikant gegenreguliert (Abb. 3.7).

Spot Nr.	UniProt Nr.	Bezeichnung	Anzahl sequenzierter Peptide	Mascot score	Sequenzabdeckung	rel. Regulation (Cyt)	rel. Regulation (Ex-4)	rel. Regulation (Cyt+Ex-4)
<b>1. durch Zytokine reprimiert</b>								
563	P06761	78 kDa glucose-regulated protein precursor (BiP)	22	275	40	0,41***	1,12**	0,54***/++
81	P63039	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60)	9	87	20	0,49***	0,74***	0,37**/+++
902	P24268	Cathepsin D precursor	10	96	28	0,51***	0,85*	0,49***
551	P06761	78 kDa glucose-regulated protein precursor (BiP)	29	310	50	0,53***	1,20**	0,60***
1168	Q920L2	succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit	8	383	56	0,57***	0,88	0,72**
446	Q68FY0	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	8	93	18	0,60***	0,88*	0,8***/+++
909	P35571	glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial precursor	18	322	44	0,63***	1,01	0,76**
1263	Q63617	150 kDa oxygen-regulated protein precursor (Orp150)	17	94	15	0,63***	1,13	0,59**
985	P06761	78 kDa glucose-regulated protein precursor (BiP)	12	97	22	0,63***	1,30**	0,66***
434	P10719	ATP-Synthase beta chain, mitochondrial precursor	21	230	46	0,66***	0,97	0,88**/+++
472	P24268	Cathepsin D precursor	6	79	19	0,67***	0,83**	0,51**/+
18	P63039	60 kDa heat shock protein precursor (Hsp60)	8	78	18	0,73***	0,84*	0,53***/++
4544	Q9ER34	aconitate hydratase, mitochondrial precursor	21	224	29	0,73***	1,01	0,71***
154	Q66HF1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) FE-S protein 1	55	408	64	0,73***	1,04	0,58**/+
868	gi 62653339	PREDICTED: similar to glucosidase II subunit precursor	9	91	21	0,74***	1,15*	0,67***
198	Q6P7A9	acid alpha glucosidase	14	126	14	0,75***	1,01*	0,65***
5	P24268	Cathepsin D precursor	9	86	23	0,76***	1,11*	0,58***/+++
4764	P15999	ATP-synthase alpha chain, mitochondrial precursor	29	277	54	0,77**	1,07	0,75**
4474	Q5XIH3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1	7	125	20	0,79*	0,99	0,60**

495	Q07984	Translocon-associated protein delta subunit precursor	7	135	44	0,80*	1,33***	0,93	
4480	P08503	acyl-CoA dehydrogenase, medium-chain specific	22	209	49	0,81	1,00	0,66	
172	P24268	Cathepsin D precursor	11	98	30	0,82**	0,99	0,64***/+	
4470	G9ER34	aconitate hydratase, mitochondrial precursor	39	350	47	0,83*	1,13	0,70***	
244	P63039	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60)	13	137	27	0,84**	0,93	0,47***/+	
<b>2. durch Zytokine induziert</b>									
486	P21807	peripherin	14	162	33	1,86***	1,54***	1,46**/+	
4858	P05197	elongation factor 2	18	145	24	1,83***	1,39	1,96***	
208	P21807	peripherin	28	318	57	1,78***	1,49***	1,45**/+	
4884	P05197	elongation factor 2	12	79	13	1,68*	1,45	2,03**	
444	P70566	tropomodulin-2	4	53	15	1,54***	0,94	1,46***	
851	P26284	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	12	139	29	1,54***	0,91	2,05**/+	
629	P34058	heat-shock protein HSP-90 beta	20	166	25	1,54***	1,20	1,70***	
442	P06761	78 kDa glucose-regulated protein precursor (BiP)	32	294	46	1,53***	1,25*	1,78**/+	
838	G91Y81	septin 2	11	172	42	1,51***	0,87	1,39**	
1048	G920L2	succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit	32	388	54	1,51*	0,84	2,40**/+	
4726	P16638	ATP-citrate synthase	18	160	15	1,48*	0,94	1,35	
4548	G6TXG7	serine hydroxymethyl transferase (mitochondrial)	15	158	30	1,38***	0,95	1,23**	
592	G6AXW2	tropomodulin-3	10	106	31	1,36***	0,83**	1,4***	
568	P09456	cAMP dependent protein kinase type 1-alpha regulatory subunit	10	116	27	1,35***	1,04	1,61**/+	
513	P08753	guanine nucleotide-binding protein G(k), alpha subunit	11	111	26	1,35*	0,94	1,45**	
940	G9JID2	guanine nucleotide-binding protein alpha-11 subunit	11	105	34	1,34*	0,95	1,61**/+	
4598	P05065	fructose biphosphate aldolase A	23	267	63	1,31***	0,92	1,06++	
4569	P04797	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	14	156	48	1,30*	0,96	1,58**/+	

4573	P04797	glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH)	dehydrogenase	13	136	43	1,30*	0,96	1,44***
236	P30033	guanine nucleotide-binding subunit 2	protein G(o), alpha	13	160	41	1,24*	0,81	1,40***
520	P82471	guanine nucleotide-binding subunit	protein G(q), alpha	19	176	52	1,20**	0,89	1,34***
254	P82471	guanine nucleotide-binding subunit	protein G(q), alpha	20	198	49	1,16*	0,85	1,30***
<b>3. nicht durch Zytokine reguliert</b>									
1363	Q63617	150 kDa oxygen-regulated protein (Orp150)	precursor	27	161	24	0,71	1,11	0,70*
6	P24268	Cathepsin D precursor		12	121	34	0,89	0,95	0,65***/+++
233	P23565	alpha-internexin		16	170	35	0,95	1,40	0,70
4788	Q6UPE1	electron-transfer flavoprotein-ductase	ubiquinone oxidore-	14	145	28	0,96	1,07	0,77***/+++
888	Q9JID2	guanine nucleotide-binding unit	protein alpha-11 sub-	11	111	31	1,05	0,91	1,18*/+
906	Q64119	myosin light polypeptide 6		9	126	62	1,13	0,96	1,52**/+
4745	Q9ER34	aconitate hydratase, mitochondrial	precursor	11	83	11	1,44	0,68	1,38

**Tabelle 3.1: Identifikation von Proteinen mit veränderter Expression durch Zytokin- und Exendin-4-Behandlung.** Die mit Sternen versehenen Werte sind signifikant unterschiedlich von ihren Basalwerten (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). Die mit Pluszeichen versehenen Werte sind signifikant unterschiedlich von ihrem jeweiligen Zytokin-Wert (+p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,0001)

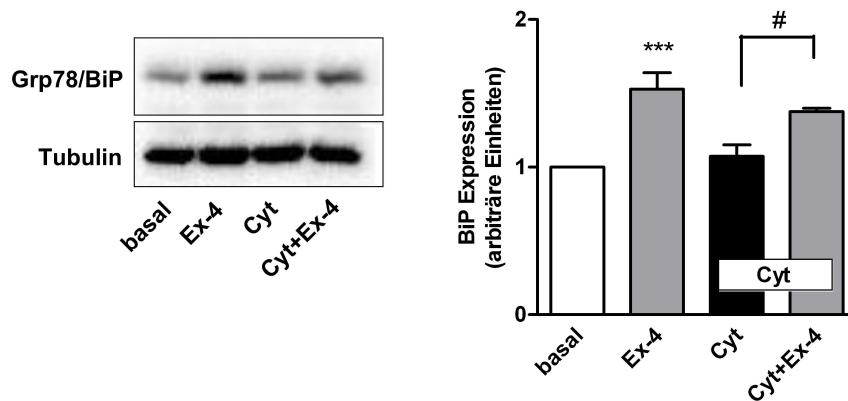


**Abbildung 3.7: Regulation von Proteinen der Atmungskette.** 3D-Darstellungen der Intensitäten der Proteinspots von NADH Dehydrogenase (Ubiquinon) Fe-S Protein 1 (A, Nr. 154), der Succinat-Dehydrogenase (Ubiquinon) Flavoprotein Untereinheit (B, Nr. 1168), dem Ubiquinol-Cytochrom c Reduktase Kernprotein 1 (C, Nr. 446) und der ATP-Synthase  $\beta$  (D, Nr. 434), jeweils markiert mit einer dunklen Raute. Die jeweiligen Faktoren (Mittelwerte) wurden der Proteomweaver-Software entnommen und beziehen sich auf den Basalwert. \*/\*\*/\*\* signifikant unterschiedlich vom Basalwert, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . +++ signif. unterschiedl. vom Zytokin-Wert,  $p < 0.001$ .

### 3.6 Regulation von Grp78/BiP durch Glp-1RA

Wie zuvor erwähnt (3.5), wurde das molekulare Chaperon Grp78/BiP durch die Behandlung mit Zytokinen reguliert. Um dies zu verifizieren, wurde eine Expressionsanalyse durchgeführt. INS-1 Zellen wurden wie zuvor mit Zytokinen und 100 nM Exendin-4 be-

handelt und die Zellen lysiert (2.2.8). Durch SDS-PAGE, Western-Blot und anschließender Immundetektion auf Grp78/BiP und Tubulin wurde die Expression von Grp78/BiP untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Expression dieses Hitzeschockproteins durch Exendin-4 signifikant induziert wird (Faktor 1,53 +/- 0,24). Die Anwesenheit von Zytokinen führt zu einer Abschwächung dieser Induktion. Zytokine allein führten dagegen zu keiner Veränderung der Grp78/Bip-Expression.



**Abbildung 3.8: Regulation der Grp78/BiP-Expression.** Nach einer fünf-stündigen Vorinkubation mit 100 nM Exendin-4 wurden INS-1 Zellen mit einem Zytokincocktail behandelt. Die Lysate (5  $\mu$ g pro Spur) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf BiP und Tubulin immundetektiert. Dargestellt sind repräsentative Blots von vier unabhängigen Experimenten. Die Auswertungen wurden mittels ECL-Reaktion mit der LumiImager-Software durchgeführt. Die Daten wurden auf die Tubulinexpression normiert und sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt, \*\*\* signifikant unterschiedlich zum Basalwert,  $p < 0,001$ ; # nicht signifikant unterschiedlich.

### **3.7 Inhibition von oxidativem Stress durch Glp-1RA**

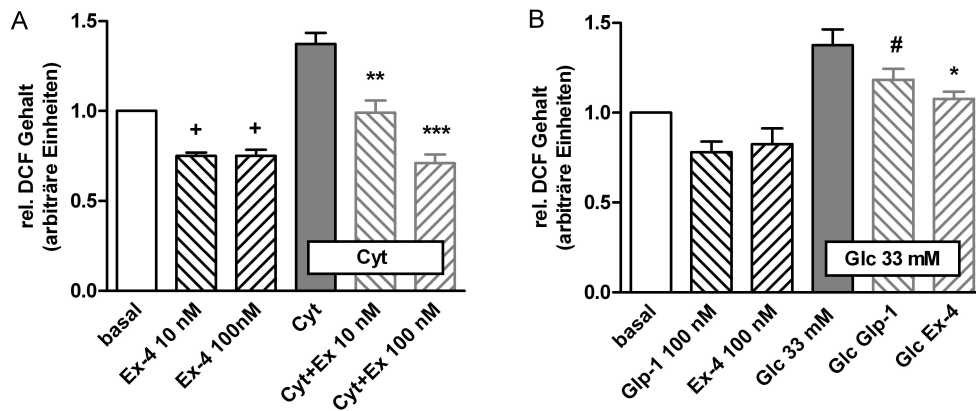
Die Veränderung mitochondrialer Atmungsketten-Proteine könnte auf eine Regulation der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies hindeuten. Um die Bildung von ROS in INS-1 Zellen untersuchen zu können, wurden Messungen mit DCF durchgeführt. Sowohl die Behandlung mit Zytokinen als auch mit hohen Glukosespiegeln führte zu einer signifikant gesteigerten Bildung von ROS (Abb. 3.9) auf das 1,4-fache des Basalwertes. Exendin-4 reduzierte die Glukose-induzierte ROS-Produktion um etwa 80 %, durch Glp-1 wurde der Wert dagegen nicht signifikant geändert. Weiterhin inhibierte Exendin-4 die Zytokin-induzierte ROS-Bildung nahezu vollständig (10 nM) bzw. über den Basalwert hinaus (100 nM). Dabei war der Effekt der höheren Konzentration signifikant stärker.

### **3.8 Auswirkungen von Glp-1RA auf die Aktivierung der Adenylatcyclase**

Im folgenden Teil sollten die proximalen Signalwege von Glp-1-Mimetika dahingehend untersucht werden, ob sie eine Rolle in der Vermittlung der anti-apoptotischen Effekte spielen. Besonders die Relevanz der Akt wurde in diesem Zusammenhang untersucht.

Nach der Bindung von Glp-1 an seinen Rezeptor wird die Adenylatcyclase durch die  $\alpha$ -Untereinheit des an den Rezeptor gekoppelten G-Proteins aktiviert und dadurch das intrazelluläre cAMP-Niveau erhöht. Um die Aktivierbarkeit der Adenylatcyclase durch Glp-1RA zu testen, wurden cAMP-Spiegel in stimulierten INS-1-Zellen gemessen.

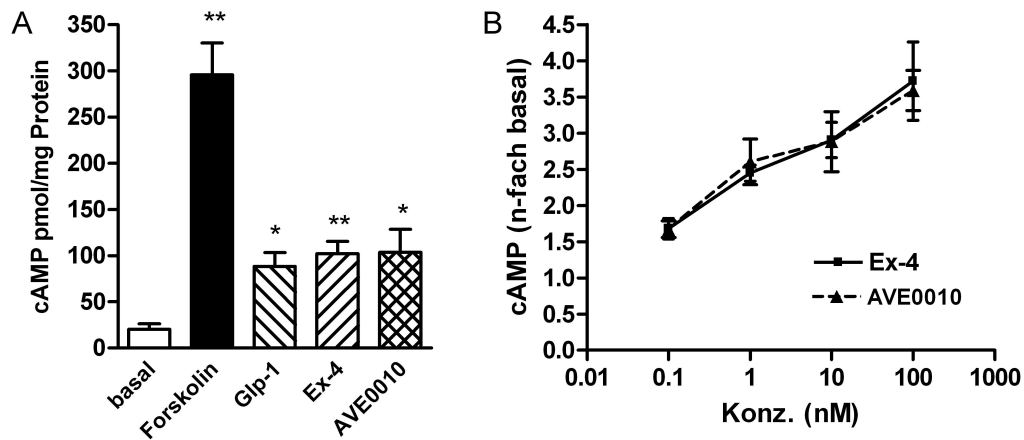
Dazu wurden die Zellen zunächst mit IMBX behandelt, um den Abbau von cAMP durch Phosphodiesterase-Aktivität zu inhibieren. Anschließend wurden die Zellen mit 100 nM Glp-1RA bzw. mit 30



**Abbildung 3.9: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Zytokin- und Glukosebehandlung.** INS-1 Zellen wurden entweder für 5 h in Hungermedium kultiviert und danach für 22 h mit Zytokinen behandelt (A) oder für 3 Tage in einem Medium mit hoher Glukosekonzentration gehalten (B). Dies geschah jeweils in Anwesenheit von Glp-1RA in den angegebenen Konzentrationen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit DCF beladen, danach lysiert und der Gehalt an oxidiertem DCF bestimmt (2.2.12). Die Daten stammen jeweils aus drei unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt + signifikant unterschiedlich von basal,  $p < 0,05$ , \* signif. unterschiedl. vom Glukose-Wert,  $p < 0,05$ , \*\*/\*\* signif. unterschiedl. vom Zytokin-Wert, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , # nicht signif.

$\mu$ M Forskolin für 30 min inkubiert. In den Lysaten wurde dann der cAMP- und Proteingehalt bestimmt. Es zeigte sich, dass alle Glp-1RA etwa in gleicher Weise den intrazellulären Gehalt an zyklischem AMP signifikant und konzentrationsabhängig steigern (Abb. 3.10).





**Abbildung 3.10: Messung von cAMP Spiegeln nach Glp-1RA-Stimulus.** INS-1 Zellen wurden für 30 min mit je 100 nM (A) bzw. 0,1-100 nM (B) Glp-1RA in Anwesenheit von IBMX inkubiert. Als Positivkontrolle diente Forskolin. Die Messung von intrazellulärem cAMP erfolgte über den cAMP ELISA nach Herstellerprotokoll. Die Daten stammen aus drei (A) bzw. zwei (B) unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

### 3.9 Auswirkungen von Glp-1RA auf die Aktivierung der Akt

Die Akt (oder Proteinkinase B) ist eine Serin/Threonin- Kinase, die an der Zellproliferation und Apoptose beteiligt, aber auch Teil der Insulinsignalkaskade ist. Bekannt sind insgesamt 3 Isoformen, wobei Akt1 und Akt3 ubiquitär, die Akt2 vor allem in insulinempfindlichen Geweben exprimiert ist. Die Kinase liegt unterhalb der PI3-Kinase und wird durch diese an die Zellmembran rekrutiert, wo sie von anderen Kinasen an ihren Phosphorylierungsstellen Ser<sup>473</sup> und Thr<sup>308</sup> phosphoryliert und somit aktiviert wird. In diesem Versuch sollte die Aktivierung der Akt durch die Glp-1RA untersucht werden.

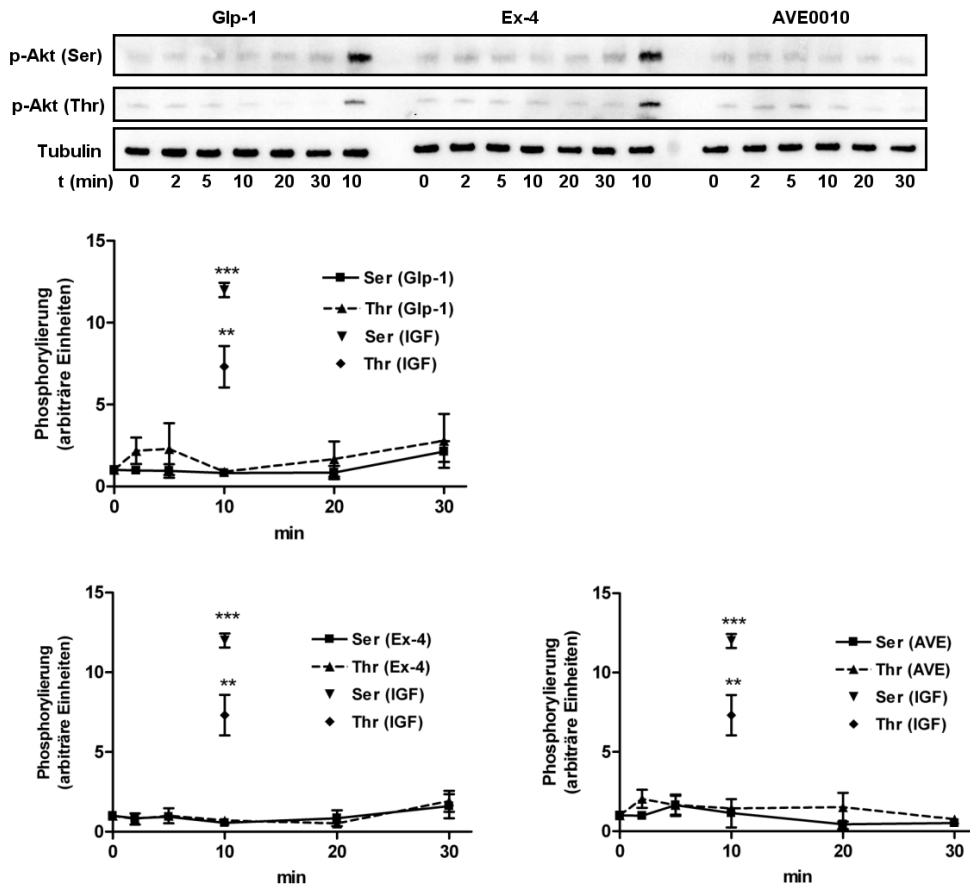
Dazu wurden INS-1 Zellen für 0 bis 30 Minuten bzw. 24 Stunden

mit je 10 nmol/l Glp-1, Exendin-4 oder AVE0010 inkubiert. Als Positivkontrolle diente 10 nmol/l IGF-1 für 10 Minuten. Im Western Blot wurde die relative Phosphorylierung und die Expression der Akt in Gesamtzelllysaten bestimmt.

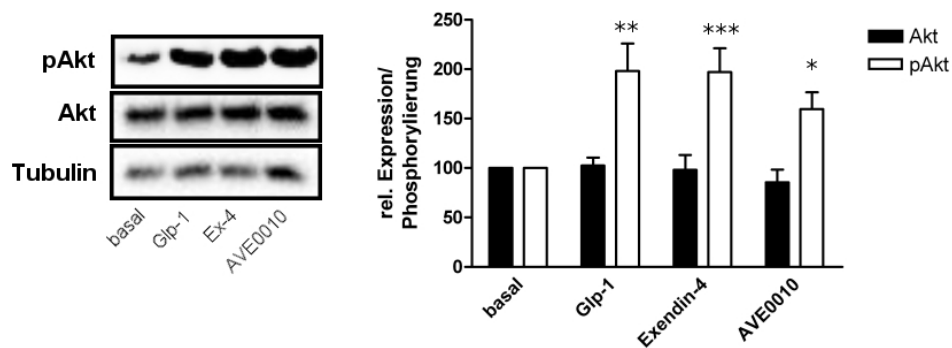
Dabei konnte festgestellt werden, dass die Akt nicht akut innerhalb von 30 Minuten von den Glp-1RA phosphoryliert wird. Bei IGF-1 ergab sich dagegen nach 10 Minuten eine starke Aktivierung (Faktor 12,0 +/- 0,4 bzw. 7,3 +/- 1,2) an beiden Phosphorylierungsstellen (Abb. 3.11). Über einen längeren Zeitraum wurde die Akt allerdings an Ser<sup>478</sup> etwa zweifach über dem Basalwert phosphoryliert, ohne in ihrer Expression verändert zu werden (Abb. 3.12).

### **3.10 Transiente Genrepression der Akt**

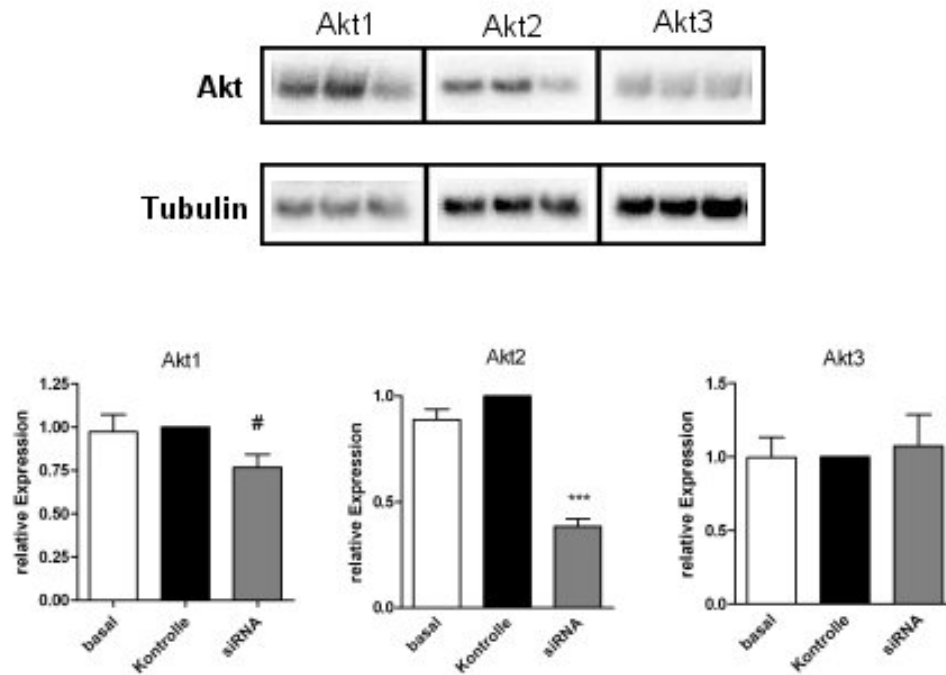
Um die Rolle der Akt in der Glp-1 rezeptorvermittelten antiapoptotischen Wirkung besser untersuchen zu können, wurde die Akt 2 mittels siRNA transient reprimiert. Hierfür wurden 20 nM doppelsträngige siRNA-Moleküle gegen die Akt 2 (UGCCCUUCUACAACCAGGAdTdT) in INS-1 Zellen transfiziert (2.2.7). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert (2.2.8) und die Lyse in einem 10-prozentigen SDS-Gel aufgetrennt. Mittels Western-Blot-Analyse mit anschließender ECL-Detektion wurden mit spezifischen Antikörpern gegen alle drei Isoformen der Akt die Genrepression quantifiziert. Mit diesem Ansatz ließ sich die Expression der Akt 2 auf 38,3 ( $\pm$  0,04) % reduzieren. Die Expression der beiden anderen Isoformen blieb dagegen unverändert (Abb. 3.13).



**Abbildung 3.11: Kurzzeitige Aktivierung der Akt durch Glp-1 Rezeptoragonisten.** (oben) INS-1 Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit Glp-1 Rezeptoragonisten bzw. IGF-1 als Kontrolle (je 10 nmol/l) inkubiert. Die Lysate (5  $\mu$ g pro Spur) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf phospho-Akt (Thr), phospho-Akt (Ser) und Tubulin immunodetektiert. Dargestellt sind repräsentative Blots von drei unabhängigen Experimenten. (unten) Die Auswertungen wurden mittels ECL-Reaktion mit der Lumilmager-Software durchgeführt. Die Daten wurden auf die Tubulinexpression normiert und sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$



**Abbildung 3.12: Langzeitige Aktivierung der Akt durch Glp-1 Rezeptoragonisten.** INS-1 Zellen wurden für 24 h mit je 100 nmol/l Glp-1 Rezeptoragonisten behandelt. Die Lysate (5  $\mu$ g pro Spur) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und nach phospho-Akt, Akt und  $\alpha$ -Tubulin immunodetektiert. Dargestellt sind repräsentative Blots aus drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind auf Tubulin normierte Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*/\*\*/\*\* signifikant unterschiedlich zum Basalwert, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



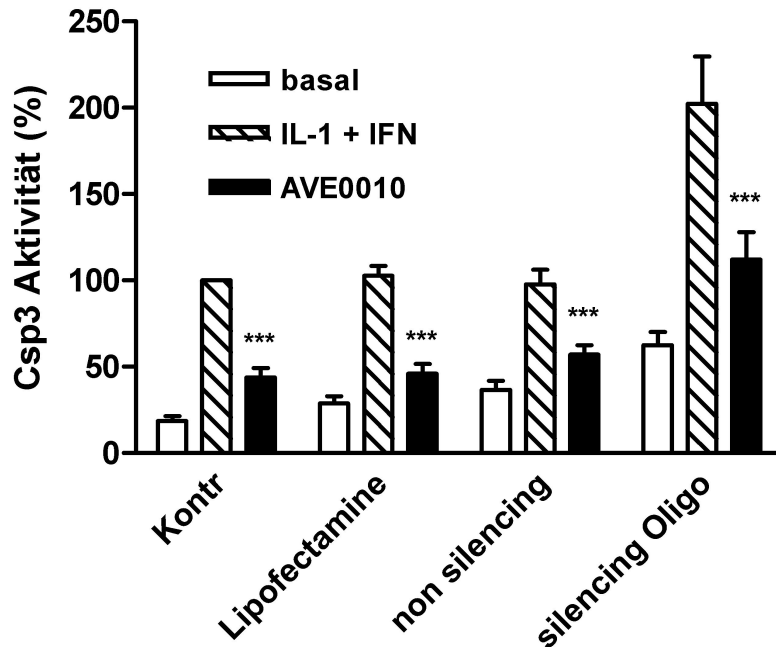
**Abbildung 3.13: Transiente Genrepression der Akt.** INS-1 Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit einer Akt 1/2-spezifischen siRNA (20 nmol/l) mittels Lipofektion transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert, die Zellysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Akt 1-3 detektiert. Dargestellt sind repräsentative Blots von drei unabhängigen Experimenten. Die Daten sind auf die Tubulinexpression normiert und als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. # nicht signif., \*\*\*  $p < 0,001$

### **3.11 Caspase 3-Aktivität nach Repression der Akt**

Um unter diesen Bedingungen die Auswirkungen der Genrepression der Akt 2 auf die antiapoptotische Wirkung von Glp-1RA zu untersuchen, wurde die Caspase 3-Aktivität bestimmt. Dazu wurden INS-1 Zellen zunächst mit der spezifischen siRNA transfiziert (2.2.7). Nach 24 h wurde dann die Apoptose durch Zytokine in An- bzw. Abwesenheit von AVE0010 induziert und in den entsprechenden Lysaten die Caspase 3-Aktivität bestimmt. Im basalen Zustand (Werte der siRNA-Kontrolle) stieg die Aktivität nach Zytokinbehandlung um das 2,6-fache des Ausgangswertes an und wurde durch Behandlung mit AVE0010 um 69,7 ( $\pm$  11,3) Prozent reduziert. Nach Genrepression der Akt 2 verdoppelten sich sowohl die Kontroll- als auch die Zytokin-induzierten Werte. Hier lag die relative Caspase 3-Aktivität 3,2-fach über dem dazugehörigen Basalwert. Die Reduktion der Caspase 3-Aktivität durch AVE0010 blieb dagegen nahezu unverändert bei 64,7 ( $\pm$  4,7) Prozent (Abb. 3.14).

### **3.12 Kombination von Glp-1RA und Insulinanaloga**

Einige Insulinanaloga zeigen ebenfalls eine Betazell-protective Wirkung gegen Zytokin- und Fettsäure-induzierte Apoptose [220]. Dieser Effekt wird vermutlich über den Akt-Signalweg vermittelt. Wenn die antiapoptotische Wirkung von Insulinanaloga und Glp-1RA also über unterschiedliche Signalkaskaden vermittelt wird, könnte eine Kombination dieser Peptide zu einer Verstärkung dieses Effektes führen. Dies sollte im weiteren eingehender untersucht werden. Apoptose wurde hierbei entweder mit Zytokinen (1.2.2) oder mit freien Fettsäuren (1.2.2) ausgelöst, nachdem die Zellen für 5 h serumfrei mit unterschiedlichen Kombinationen aus Glp-1RA und Insulinanaloga vorbehandelt wurden.



**Abbildung 3.14: Auswirkungen des Akt Silencing aus die Glp-1 rezeptorvermittelte anti-apoptotische Wirkung.** INS-1 Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit einer Akt 1/2-spezifischen siRNA mittels Lipofection transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und nach einer Vorinkubation mit AVE0010 wurden die Zellen einem Zytokincocktail (4 ng/l IL-1 $\beta$ , 1 ng/ml IFN- $\gamma$ ) für weitere 22 h ausgesetzt. In den Lysaten (n=8) wurde die Caspase 3-Aktivität gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt, \*\*\* signifikant unterschiedlich vom Zytokin-Wert, p<0,001.

### 3.12.1 Inhibition zytokin-induzierter Apoptose

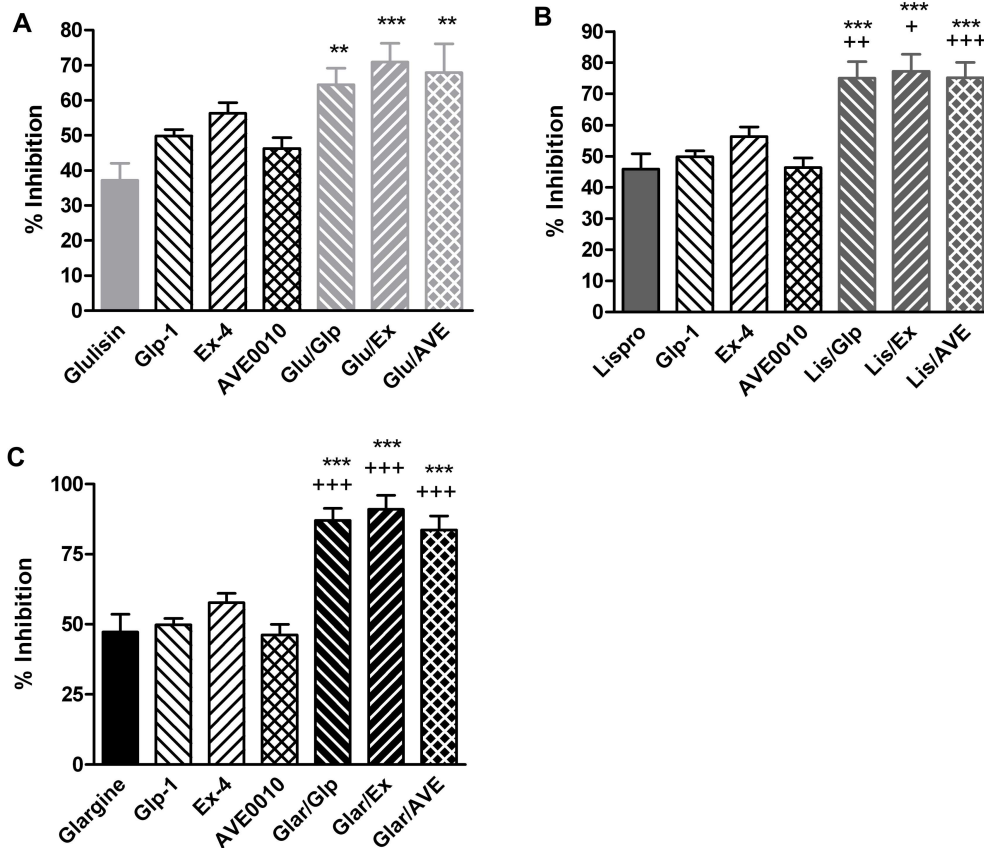
Die Insulinanaloga Glulisin, Lispro und Glargin wurden in Konzentrationen von 500 nM eingesetzt, Glp-1RA bei 100 nM. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Caspase 3-Aktivität in diesen Zellextrakten bestimmt (2.2.11). Dabei zeigte sich zunächst, dass alle drei eingesetzten Insulinanaloga die zytokininduzierte Apopto-

se in ähnlicher Weise inhibieren (Abb. 3.15): Glulisin um 37,2 (+/- 4,9), Lispro um 45,9 (+/- 4,8) und Glargin um 47,3 (+/- 6,3) Prozent. In Kombination mit Glp-1RA zeigte sich unter diesen Bedingungen ein signifikanter Anstieg auf bis zu 91,0 (+/- 5,0) Prozent im Fall von Exendin-4 kombiniert mit Insulin Glargin.

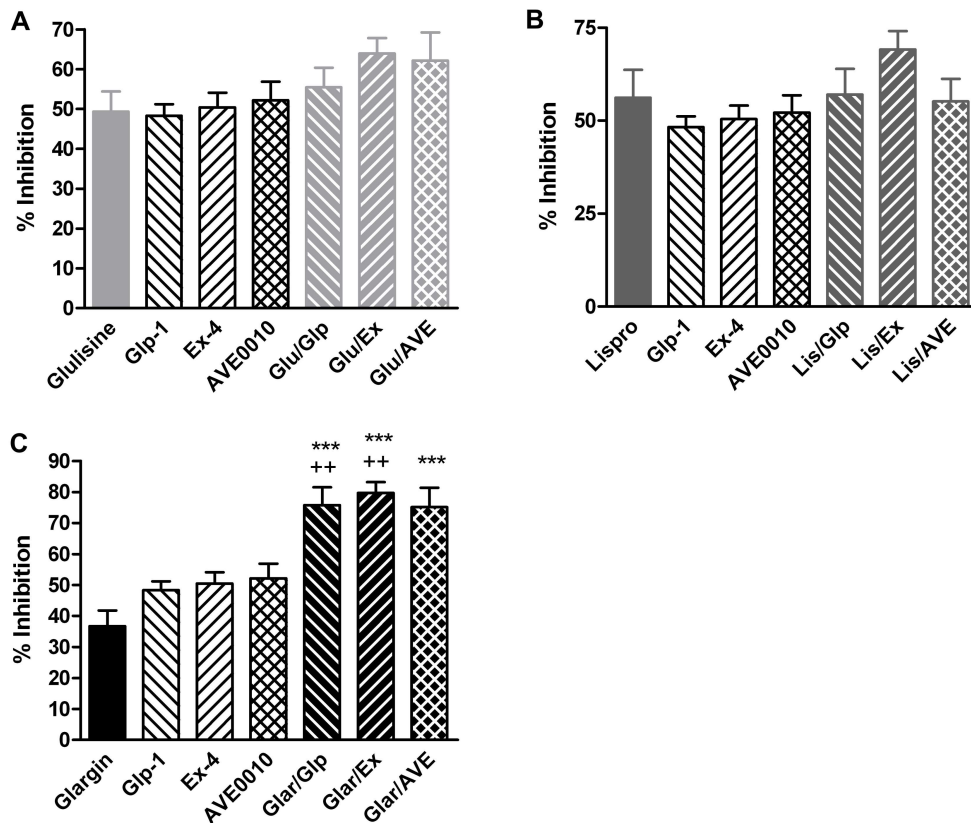
#### **3.12.2 Inhibition fettsäureinduzierter Apoptose**

Hierbei wurden sowohl die Insulinanaloga als auch die Glp-1RA in einer Konzentration von 100 nmol/l eingesetzt. Die Kerne der Zellen wurden anschließend mit Hoechst33342 angefärbt und untersucht (2.2.11). Wie bei der zytokininduzierten Apoptose zeigte sich auch mit freien Fettsäuren eine signifikante Reduktion der Apoptose durch Insulinanaloga: Insulin Glulisin reduzierte hier um 49,4 (+/- 5,0), Lispro um 56,2 (+/- 7,6) und Glargin um 36,7 (+/- 5,1) Prozent. In Kombination mit Glp-1RA zeigte sich nur bei Insulin Glargin eine signifikant erhöhte antiapoptotische Wirkung mit Werten bis zu 79,7 (+/- 3,5) Prozent (Abb.3.16).





**Abbildung 3.15: Auswirkungen von GIP-1 Rezeptoragonisten und Insulinanaloga auf die zytokininduzierte Apoptose.** Nach einer Vorinkubation mit GIP-1 Rezeptoragonisten (100 nmol/l) und Insulinanaloga (500 nmol/l) für 5 h wurden die Zellen für 22 h einem Zytokincocktail (4 ng/ml IL-1 $\beta$ ), 1 ng/ml IFN- $\gamma$  ausgesetzt. Die Messung der Caspase 3-Aktivitäten in den Zelllysaten erfolgte mit dem Caspase 3 Assay Kit (BD Biosciences) laut Herstellerangaben. Die Daten (n=6) sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. \*\*/\*\* signifikant unterschiedlich zum Insulin-Wert, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001; +/++/+++ signifikant unterschiedlich zum Wert des GIP-1-Mimetikums ohne Insulin, + p<0,05, ++ p<0,01, +++ p<0,001



**Abbildung 3.16: Auswirkungen von Gp-1 Rezeptoragonisten und Insulinanaloga auf die fettsäureinduzierte Apoptose.** INS-1 Zellen wurden in Anwesenheit von Gp-1 Rezeptoragonisten (10 nmol/l) und Insulinanaloga (100 nmol/l) für 18 h in einem fettsäurehaltigen (500  $\mu$ mol/l an BSA) inkubiert. Zur Detektion wurden die Zellen mit Hoe33342 und PI gefärbt und im Fluoreszenzbild ausgezählt. Die Daten (n=6, je 500 Zellen) sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. \*\*\* signifikant unterschiedlich zum Wert des Insulins, p<0,01, ++ signifikant unterschiedlich zum Wert des Gp-1-Mimetikums ohne Insulin, p< 0,01

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Zum verwendeten Zellmodell

Die Langerhans'schen Inseln des Pankreas bestehen aus insgesamt fünf Zelltypen und machen etwa 1-2 % der gesamten Pankreasmasse aus (Tab. 4.1). Die Insulin-sezernierenden Betazellen nehmen dabei etwa 65-80 % einer Pankreasinsel ein. Sie spielen sowohl in der Entwicklung eines Typ-1- als auch eines Typ-2-Diabetes eine große Rolle (1.2.2) und sind daher als Untersuchungsobjekt in der Grundlagenforschung unentbehrlich.

Zelltyp	Hormon	prozentualer Anteil
$\beta$	Insulin	65-80
$\alpha$	Glukagon	15-20
$\delta$	Somatostatin	3-10
PP	pankreatisches Polypeptid	1
$\epsilon$	Ghrelin	<1

**Tabelle 4.1:** Zelltypen des endokrinen Pankreas.

Idealerweise würden für Untersuchungen der Betazelle primäre Pankreasinseln verwendet, um einen möglichst nahen Bezug zum humanen Organismus herzustellen. Allerdings führt der geringe Anteil der Betazellen im Pankreas zu einer geringen Ausbeute bei der Isolation von Pankreasinseln. Auch ist der Zugang für die Grundlagenforschung limitiert. So sind Inseln humaner Spender nur post mortem entnehmbar und zunächst für die Transplantation bestimmt. Deshalb werden sie normalerweise nur für die Grundlagenforschung freigegeben, wenn sie sich nicht mehr für eine Transplantation eignen. Dennoch sind einige Studien über Betazell-Apoptose an frisch isolierten humanen Pankreasinseln beschrieben [201, 113, 134, 124, 221].

Zur Durchführung der vorliegenden Arbeit waren, insbesondere für die Proteomanalyse, größere Mengen von Zellmaterial vonnöten. Dies konnte nur durch den Einsatz einer Zelllinie gewährleistet werden. Dies wurde bereits in zwei Studien zur Untersuchung von Apoptose mittels Proteomanalyse mit Subklonen der INS-1 Zelllinie gezeigt [222, 223].

Das ideale Zellsystem zur Beobachtung der Betazell-Physiologie sollte alle Eigenschaften einer primären Betazelle besitzen. Dazu gehört ein hoher Gehalt an Insulin und die Kontrolle von Insulinbiosynthese, -prozessierung und -freisetzung durch physiologische Stimuli, allen voran Glukose.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Insulinoma-Zelllinie INS-1 verwendet. Sie wurde aus einem durch radioaktive Strahlung in Ratten erzeugtem Tumor [224] durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol generiert [225]. Sie zeigt einen beständigen Anstieg der Insulinsekretionsrate zwischen 0 und 11,2 mM Glukose und der maximale Anstieg zwischen 2,8 und 20 mM Glukose war 2,2-fach. Eine weitere Steigung wurde durch den Einsatz von IBMX erreicht [225]. Bei frisch isolierten Pankreasinseln wurde dagegen ein weitaus stärkerer, 15-facher Anstieg verzeichnet [226]. Zur Kontrolle der verwendeten Zellen wurde in dieser Arbeit die Glukose-stimulierte Insulinsekretion gemessen. Hier konnte ein etwa 6-facher Anstieg bei 10 mM Glukose im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden.

### **4.2 Die antiapoptotische Wirkung von Glp-1 Rezeptoragonisten**

Im Typ-2-Diabetes sind die Betazellen des Pankreas erhöhten Konzentrationen von Glukose und freien Fettsäuren, aber auch pro-inflammatorischen Zytokinen ausgesetzt (1.2.2), was bei chronischem Verlauf zu Apoptose führt. Diese Bedingungen wurden am vorliegenden Modell der INS-1 Betazelllinie simuliert, um die anti-

apoptotischen Wirkungen von Glp-1 Rezeptoragonisten untersuchen zu können. Insgesamt wurden drei Glp-1RA untersucht, darunter das biologisch aktive Glp-1(7-36)-amid, Exendin-4 und das neuartige Mimetikum AVE0010. Die anti-apoptotische Wirkung von AVE0010 wurde in dieser Arbeit erstmals studiert. Dabei war es von besonderem Interesse, ob sich durch die verstärkte Affinität von AVE0010 zum Glp-1 Rezeptor auch eine erhöhte Betazell-protective Wirkung nachweisen lässt.

Apoptose kann mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden, darunter die Messung von DNA-Einzelstrangbrüchen, Bestimmung von Caspase-Aktivitäten, Untersuchung der Freisetzung von Nucleosomen oder Cytochrom c, Veränderungen in der Plasmamembran-Struktur oder in der Morphologie der Zellkerne. Dabei ist zu beachten, dass die einzelnen Apoptose-Merkmale im Verlauf der Apoptose zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftreten. In der vorliegende Arbeit wurde sowohl die Aktivität der Caspase 3 bestimmt, als auch die Chromatinkondensation in den Nuklei beobachtet. Beide Ereignisse stehen am Ende der Apoptose-Kaskade und man kann davon ausgehen, dass bei Eintreten dieser ein Zeitpunkt erreicht ist, bei dem kein Abbruch der Apoptose mehr möglich ist. Die Messung der Caspase-3-Aktivität erlaubt eine Aussage über die relative Intensität der Apoptose und bietet so gute und verlässliche Vergleichsmöglichkeiten zwischen verschiedenen Situationen. Allerdings ist die basale apoptotische Aktivität mit dieser Methode nicht messbar. Auch erlaubt sie keine Aussage über Caspase-unabhängige Apoptose oder Nekrose. Die Messung der Kernkondensation und -fragmentation ermöglicht eine direkte und absolute Messung von Apoptose, und durch die Gegenfärbung mit Propidiumjodid lässt sich auch Nekrose von Apoptose unterscheiden.

Glukose-induzierte Apoptose wurde durch die 3-tägige Behandlung von INS-1 Zellen mit 33 mM Glukose erreicht. Diese Konzentration erzeugt auch in humanen Pankreasinseln eine starke apoptotische Reaktion [112]. Im Gegensatz zu humanen Pankreasinseln verbessert ein Anstieg der Glukosekonzentration bis 11 mM die Überle-

bensfähigkeit von Inseln aus Ratten, erst oberhalb dieser Konzentration tritt Apoptose auf (1.2.2) [110]. Aufgrund dieser Tatsache wurde als Kontrolle das Basalmedium mit einer Glukosekonzentration von 11 mM gewählt. In der anti-apoptotischen Wirkung zeigte sich Exendin-4 wirksamer als Glp-1 selbst. Dies spiegelt sich auch in seiner Wirkung gegen die Glukose-induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wieder (3.7). Dort zeigte sich Glp-1 wirkungslos, wogegen Exendin-4 eine signifikante Reduktion der ROS-Bildung erreichte. Für Exendin-4 ist bereits bekannt, dass es in der Lage ist, durch  $H_2O_2$  -induzierten oxidativen Stress zu inhibieren. Dies wird mit der durch Exendin-4 verursachten verminderten Expression von TXNIP (*thioredoxin-interacting protein*) in Verbindung gebracht [227], welches in Zusammenhang mit dem zellulären Redoxstatus und der Betazell-Apoptose steht [228].

Freie Fettsäuren werden aus dem Fettgewebe durch Lipolyse freigesetzt und dienen als wichtige Energiequelle für verschiedene Organe. Chronisch erhöhte FFA-Konzentrationen führen allerdings zur Dysfunktion und Apoptose der insulinproduzierenden Betazellen (1.2.2). In der Kombination mit Glukose können freie Fettsäuren synergistisch Betazell-Apoptose hervorrufen [129]. Deshalb wurde bei der Auslösung von Apoptose mit FFA in dieser Arbeit die Glukose-Konzentration auf 5,5 mM gesenkt, um den alleinigen Effekt von Fettsäuren untersuchen zu können. Aufgrund ihrer Hydrophobizität liegen langkettige Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure im Serum gebunden an Albumin vor [229]. Im Modell werden Fettsäuren daher oft an BSA gekoppelt, bevor sie zur Zell-Behandlung eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde Palmitinsäure in einem molaren Verhältnis von 3:1 an BSA gebunden. Dieses Verhältnis spiegelt die Bindungskapazität von BSA wieder und wurde ebenfalls in anderen Studien so eingesetzt [220, 230, 231]. Da FCS dieses Verhältnis verändern würde, wurde während der Stimulation FCS-freies Medium verwendet. Dies kann allerdings auch zu einer Erhöhung der basalen Apoptoserate führen, weshalb die entsprechende Kontrolle ebenfalls ohne FCS behandelt wurde. Die Anzahl

apoptotischer Zellen wurde durch die Behandlung mit Palmitinsäure etwa vierfach erhöht. Alle Glp-1RA reduzierten diesen Effekt um ca. 40-50 % bei einer Konzentration von 100 nM, bei geringeren Konzentrationen (10 nM) konnte allerdings kein anti-apoptotischer Effekt mehr nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Glp-1RA wurden nicht festgestellt.

Die verwendeten Konzentrationen der Glp-1RA sind aus der aktuellen Literatur zur Untersuchung ihrer anti-apoptotischen Eigenschaften entnommen, gängig sind Konzentrationen zwischen 1 und 100 nM [201]. Man muss sich allerdings die Frage stellen, ob dies auch *in vivo* relevant ist. Im nüchternen Zustand findet sich im humanen Blutplasma 7 (+/- 1) pM amidiertes Glp-1, postprandial steigt dieser Spiegel auf 40 (+/- 5) pM an [232]. In der hier vorliegenden Arbeit wurden Konzentrationen ab 100 pM getestet, die auch in geringem Umfang anti-apoptotisch wirkten. In physiologischen Konzentrationen ist also vermutlich nur ein geringer anti-apoptotischer Effekt zu erwarten. Im Tierversuch mit einem Rattenmodell für Typ-2-Diabetes (ZDF-Ratte) erwies sich eine zweitägige Infusion mit 30 pmol/kg min als anti-apoptotisch wirksam [200]. Als Antidiabetikum ist Exendin-4 (Byetta) bei Typ-2-Diabetikern in Kombination mit Metformin oder Sulfonylharnstoffen zugelassen. Standardmäßig werden hier zweimal täglich 5 bzw. 10 µg injiziert. In klinischen Studien ließen sich im Blutplasma 10 Stunden nach Injektion von 10 µg Exendin-4 220 pg/ml Wirkstoff nachweisen [233], das entspricht einer Konzentration von ungefähr 50 pM. Höhere Konzentrationen waren mit teils erheblichen Nebenwirkungen verbunden [233]. Ob die therapeutisch eingesetzten Konzentrationen bei Typ-2-Diabetikern zur Erhaltung der Betazellmasse beitragen, bleibt also abzuwarten.

Beim Typ-1-Diabetes kommt es zur Infiltration von Makrophagen in das Pankreas, wo sie pro-inflammatorische Zytokine freisetzen und somit die Betazell-Apoptose induzieren. Neuere Studien belegen aber auch im Typ-2-Diabetes eine Einwanderung von Immunzellen in das Pankreas. Außerdem stimuliert Glukose die Frei-

setzung von IL-1 aus den Betazellen selbst (1.2.2). Die Kombination von IL-1 $\beta$  und Interferon- $\gamma$  dient in vielen Studien als Modell der Betazell-Inflammation [230, 234, 222], und wurde hier ebenfalls eingesetzt, um die anti-apoptotische Wirkung von Glp-1-Mimetika zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zytokin-induzierte Apoptose durch Glp-1RA (10 nM) um etwa 60 % inhibiert. In hohen Konzentrationen (10-1000 nM) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Peptiden festgestellt werden. Lediglich bei einer Konzentration von 100 pM war die Wirkung von Exendin-4 und AVE0010 stärker als die von Glp-1 selbst. Ob dies an der erhöhten Stabilität der Glp-1-Analoga liegt, ist schwer zu beurteilen, da in diesem System kein Abbau durch die DPP-4 stattfindet. In Tierexperimenten konnte allerdings gezeigt werden, dass Glp-1 trotz seiner kurzen Halbwertszeit einen persistierenden Effekt aufweist [235].

### **4.3 Analyse mitochondrialer Proteinmuster nach Exendin-4-Behandlung unter Apoptose**

Zur Analyse der Wirkung von Exendin-4 auf das Proteinmuster isolierter Mitochondrien wurde hier die Methode der zweidimensionalen differentiellen Gelelektrophorese (2D-DIGE) verwendet. Diese neuartige Fluoreszenztechnik zur Markierung von Proteinen in Gelen ermöglicht einen großen Spielraum in der Co-Separation und Detektion verschiedener Proben, und durch den Einsatz eines internen Standards eine Quantifizierung von Proteinen von großer statistischer Aussagekraft. In INS-1 Zellen wurde diese Technik bereits erfolgreich zur Untersuchung Zytokin-induzierter Apoptose angewendet [222].

Aktuelle Studien stellen die Mitochondrien in den Fokus der Apoptoseregulation. Sie sind nicht nur die Hauptquelle für ROS in der



Zelle, sondern regulieren die Apoptose über bcl-Proteine durch Ausschüttung pro-apoptotischer Faktoren (1.2.1). Aufgrund dieser Überlegungen wurden in der vorliegenden Arbeit die Effekte von Exendin-4 gegen zytokininduzierte Apoptose auf Ebene des Mitochondrien-Proteoms untersucht.

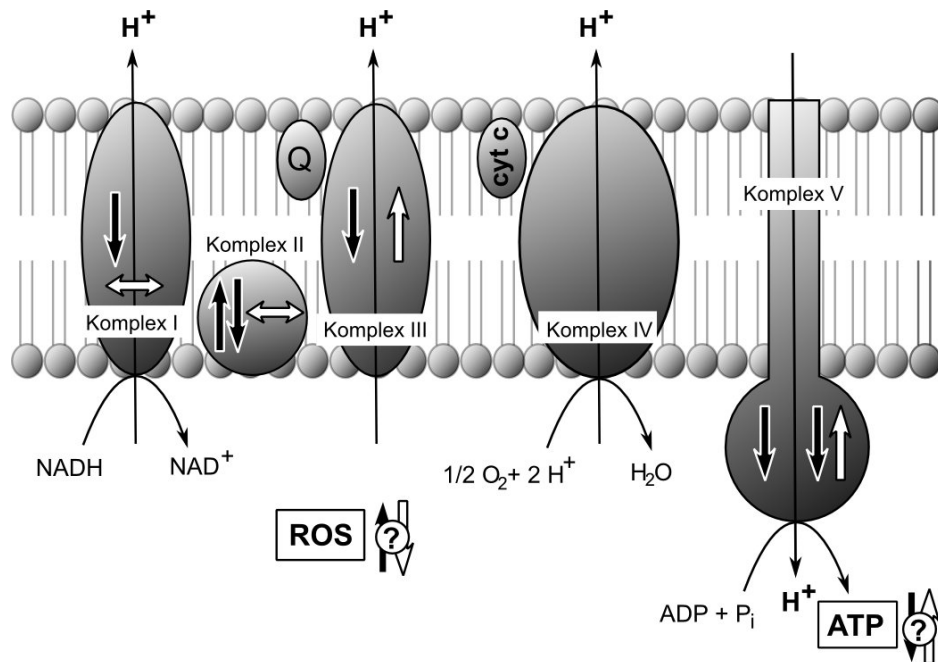
Die Reinheit der Mitochondrien-Präparation spiegelt sich in der subzellulären Lokalisation der identifizierten Proteine wieder. Der Hauptanteil (47 %) konnte eindeutig Mitochondrien zugeordnet werden, einige Proteine sind im ER (9 %), andere in Lysosomen (6 %) lokalisiert. Die restlichen identifizierten Proteine (38 %) konnten keinem zellulären Kompartiment eindeutig zugeordnet werden.

Die Mehrzahl der identifizierten Proteine sind am Metabolismus beteiligt, darunter auch Proteine der mitochondrialen Atmungskette. Mitglieder von vier der fünf Proteinkomplexe der Elektronentransportkette wurden identifiziert: Das NADH Dehydrogenase (Ubiquinon) Fe-S Protein 1 (Komplex I), Die Succinat-Dehydrogenase (Ubiquinon) Flavoprotein Untereinheit (Komplex II), Das Ubiquinol-Cytochrom c Reduktase Kernprotein 1 (Komplex III) und die ATP-Synthase (Komplex V).

Die mitochondriale Atmungskette ist die Hauptquelle von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies und gleichzeitig ein Angriffspunkt der schädigenden Effekte von ROS. Da die Zelle auf den kontinuierlichen Energiefluss und die Bildung von ATP angewiesen ist, kann jede Veränderung der Atmungskette zu einer Schädigung der Zelle führen. Das Hyperoxid-Anion ( $O_2^-$ ) entsteht als relativ stabiles Intermediat bei der Reduktion von Sauerstoff während der Atmung und dient als Vorläufer der meisten ROS in der Zelle. Etwa 1 % des verbrauchten Sauerstoffs wird so schätzungsweise in ROS umgewandelt [236]. Des Weiteren kann die Hyperoxid-Produktion gesteigert werden, wenn die Rate des Elektronentransports durch den Aufbau eines Protonengradienten in der inneren mitochondrialen Membran limitiert wird. Solch ein Protonenüberschuss tritt entweder auf, wenn es zu einer Unterversorgung mit Reduktionsäquivalenten in Form von NADH oder zu einer funktionellen Beeinträchti-

gung von Komplexen der Atmungskette (vor allem Komplexe I und III) kommt [237]. Durch Disproportionierung kann aus den gebildeten Hydroperoxid-Anionen Wasserstoff-Peroxid entstehen, welches in Anwesenheit von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen hochreaktive Hydroxylradikale bilden kann (Fenton-Reaktion). Die Veränderungen in der Abundanz der identifizierten Proteine der Atmungskette lassen also auf einen Anstieg der ROS-Konzentrationen in INS-1-Zellen nach Zytokin-Behandlung schließen, die möglicherweise durch Exendin-4 unterbunden werden kann (Abb. 4.1). Dies konnte durch Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF tatsächlich gezeigt werden (3.7). Allerdings lässt diese Methode keinen Schluss auf die Art der gebildeten ROS zu, da DCF nicht speziell auf eine bestimmte Sauerstoffspezies reagiert. Dennoch konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass Exendin-4 durch Regulation der Atmungskette antioxidativ wirken kann. Dies wird durch eine Studie unterstützt, in der die Wirkung von Exendin-4 gegen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Apoptose in INS-1 Zellen gezeigt werden konnte [227].

ROS verursachen in der Zelle speziell im Mitochondrium zahlreiche Schäden an der DNA, an Proteinen und an Lipiden. Ein wichtiger Mechanismus ist hier die Inaktivierung von FE-S-Proteinen, darunter Proteine der Atmungskette inklusive der ATP-Synthase und der Aconitase [80, 238]. Dies führt einerseits wiederum zu einer sich verstärkenden ROS-Bildung, andererseits zur Reduktion der ATP-Spiegel in der Zelle. Exendin-4 konnte hier die Zytokin-induzierte Repression der  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase gegenregulieren (Abschnitt 3.5), was ebenfalls zu seiner anti-apoptischen Wirkung beitragen könnte. Eine aktuelle Studie zeigt auch eine Regulation der ATP-Synthase- $\beta$  durch hohe Glukose- und Fettsäure-Konzentrationen [239]. Auch führt eine Mutation im ATP-Synthase-Gen in Ratten zur einer verminderten Glukosetoleranz, Betazell-Apoptose und oxidativem Stress [240]. Die mitochondriale Aconitase wurde ebenfalls durch die Behandlung mit Zytokinen verändert. Zwei der identifizierten Proteinspots waren in ihrer Abundanz verringert, was möglicherweise auf eine Inaktivie-



**Abbildung 4.1: Regulation von Proteinen der Atmungskette durch Zytokine und Exendin-4.** Die Behandlung mit Zytokinen führt zu Expressionsänderungen in Proteinen der mitochondrialen Atmungskette (schwarze Pfeile), die teilweise durch Exendin-4 gegenreguliert werden (weiße Pfeile). Dies führt zu Veränderungen der ROS- und ATP-Produktion und wirkt sich möglicherweise so auf die Betazell-Apoptose aus.

Die Inaktivierung dieses Enzyms schließt die Aconitase. So ist bereits bekannt, dass Interleukin-1 die Aconitase durch eine gesteigerte NO-Produktion inhibiert [241]. Dies hat zwei Folgen für die Zelle: Zum einen wird durch ROS labiles Fe<sup>2+</sup> aus dem Fe-S-Zentrum der Aconitase gelöst und es kommt gleichzeitig zur Freisetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [242, 243], was wiederum die Fenton-Reaktion begünstigt. Zum anderen hat die Aconitase eine zentrale Rolle im Citratzyklus, wo sie die Umwandlung von Citrat zu Isocitrat katalysiert. Ihre Inaktivierung könnte also zu einer Verminderung der metabolischen Aktivität und einer verringerten ATP-Produktion führen. Ein Einfluss von Exendin-4 auf die Regulation der Aconitase könnte in der hier vorliegenden

Arbeit allerdings nicht beobachtet werden.

Ein weiterer Mechanismus, wie ROS die Apoptose stimulieren können, ist die Begünstigung der Cytochrom-c-Freisetzung, die einen wichtigen Schritt zur Induktion der Caspase-Kaskade darstellt (Abschnitt 1.2.1). Normalerweise ist Cyt c an der inneren mitochondrialen Membran durch das Phospholipid Cardiolipin verankert [244], wo es am Elektronentransport zwischen Komplex III und IV der Atmungskette beteiligt ist. Die Bindung von Cyt c wird durch die Peroxidation von Cardiolipin geschwächt [245] und sein Gehalt in der inneren Mitochondrienmembran verringert sich in Anwesenheit von ROS [246]. So ist möglicherweise die Schwächung der Cardiolipin-Cyt c-Bindung nötig, um Cyt c aus dem Mitochondrium freizusetzen [247].

In den letzten Jahren gewann die Erkenntnis mehr und mehr an Bedeutung, dass ER-Stress am Betazell-Tod beteiligt ist [248]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Exendin-4 Thapsigargin-induzierten ER-Stress in Betazell-Linien und isolierten Pankreasinseln der Ratte inhibieren kann [214]. Einige der hier identifizierten Proteine sind im ER lokalisiert, was vermutlich durch Verunreinigungen in der Mitochondrien-Aufreinigung begründet liegt. Dies könnte allerdings Hinweise auf die Beteiligung von ER-Stress im verwendeten Modell geben. Das molekulare Chaperon BiP/Grp78 (s. auch 1.2.1) wurde in vier Proteinspots gefunden, wobei durch Zytokin-Behandlung eine Verschiebung hin zu dem im sauren Bereich liegenden Spot stattfand, möglicherweise durch Phosphorylierung. Exendin-4 übte allem Anschein nach auf diesen Prozess keinen Einfluss aus. Um die Rolle von BiP/Grp78 in der vorliegenden Situation besser beurteilen zu können, wurde die Expression dieses Proteins nach Zytokin- und Exendin-4-Behandlung untersucht. Es zeigte sich eine klare Expressionssteigerung von BiP/Grp78 durch Exendin-4, die nach Zytokin-Behandlung leicht vermindert war. Zytokine allein veränderten die Expression von BiP/Grp78 allerdings nicht (Abschnitt 3.6). Eine verstärkte Expression von BiP/Grp78 könnte zu einer reduzierten Betazell-Apoptose führen. Ei-

ne Studie belegt, dass die Überexpression dieses Chaperons zu einem Schutz gegen Fettsäure-induzierte Apoptose führt [144]. Eine Phosphorylierung resultiert dagegen in einer reduzierten Bindungskapazität von Bip/Grp78 an Proteine [249], was möglicherweise zu einer verminderten Fähigkeit führt, fehlgefaltete Proteine wieder in ihren korrekten Zustand zu überführen [222]. Dies würde zusammengenommen eine Hypothese unterstützen, in der Zytokine zu einer Modifikation und funktionellen Inhibition von BiP/Grp78 führen, während Exendin-4 durch eine Verstärkung der Expression diesem Effekt entgegenwirkt. Um dies zu verifizieren, müssten allerdings noch weitere Marker von ER-Stress in diesem Zusammenhang untersucht werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Proteomanalyse vom isolierten endoplasmatischen Retikulum nach Behandlung mit Exendin-4. Dies könnte weitere Zielproteine von Exendin-4 aufzeigen, die bei seiner antiapoptischen Wirkung beteiligt sind.

#### **4.4 Signaltransduktion von Glp-1**

Die Aktivierung der Adenylatcyklase und die Produktion von cAMP sind Schlüsselsignale in der Wirkung von Glp-1 Rezeptoragonisten auf die Betazelle [250]. In dieser Arbeit konnte die Steigerung intrazellulärer cAMP-Spiegel eindeutig gezeigt werden. Einige Studien legen dagegen nahe, dass Glp-1 ebenfalls den PI3-K-Signalweg aktiviert [251, 252], möglicherweise über eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors [205, 250] oder eine verstärkte Expression von IRS-2 [253, 254]. Wang et al. konnten in INS-1 Zellen eine schnelle (nach 5 Minuten) 2 bis 3-fache Akt(Ser<sup>473</sup>)-Phosphorylierung nach Glp-1-Stimulus nachweisen, die etwa 3 bis 4 Stunden anhielt [204]. In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen mit keinem der verwendeten Glp-1-Mimetika eine Aktivierung der Akt, weder am Serin<sup>473</sup> noch an Threonin<sup>308</sup>, nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle IGF-1 induzierte dagegen eine starke Akt-Phosphorylierung (3.9). Allerdings wurde die Akt durch eine Langzeitbehand-

lung über 24 Stunden mit Glp-1RA ohne eine Veränderung der Akt-Proteinexpression etwa 2-fach stimuliert, passend zu einer früheren Studie [255]. Dies würde ein Modell unterstützen, bei dem die durch Glp-1 erhöhten cAMP-Spiegel zu einer CREB-vermittelten Induktion von IRS-2 führen [256], gefolgt von einer Aktivierung des PI3-K / Akt-Signalwegs [254]. Auf der anderen Seite konnte hier durch die Genrepression der Akt gezeigt werden, dass dieser Signalweg für die anti-apoptotische Wirkung von Glp-1-Mimetika nicht funktionell relevant ist (3.11).

Die Akt ist unter anderem ein Mediator der Vitalität und der Apoptose-Inhibition in einer großen Zahl verschiedener Zelltypen [257]. Dennoch bleibt es zu klären, ob die 3 bekannten Isoformen dieser Kinase unterschiedliche Funktionen haben. Es ist bisher unklar, ob alle Isoformen der Akt in primären Betazellen exprimiert werden, aber INS-1 Zellen zeigen eine deutliche Expression der Akt 1-3 [258]. Dennoch ist nicht geklärt, in welchem Verhältnis untereinander die Isoformen exprimiert sind. Es existieren zwei Maus-*knockout*-Modelle, in denen die Gene von Akt1 [206] bzw. Akt2 [207, 208] ausgeschaltet wurden. Dabei entwickelt die Akt2-*k.o.*-Maus einen schweren Diabetes, der mit einem Verlust der Betazellen einhergeht [208]. Die Akt1-*k.o.*-Maus zeichnet sich zwar durch ein verlangsamtes allgemeines Körperwachstum aus, zeigt aber keine Veränderungen hinsichtlich ihrer Glukosetoleranz oder der Betazellmasse [206]. Daher scheint der Erhalt der Betazellmasse von der Akt2 abhängig zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Akt2 mittels siRNA-vermittelter Genrepression untersucht. Der Vorteil gegenüber der Überexpression einer dominant negativen Variante liegt hier in der tatsächlichen Verringerung des endogen vorhandenen Proteins. Ein eingebrachtes mutiertes Protein könnte durch seine veränderte Konformation andere Proteine potentiell binden, die keine Bindungspartner des endogenen Proteins darstellen, was zu unkontrollierbaren Nebenerscheinungen führen würde. Deshalb wurde die Rolle der Akt mit dieser Methode untersucht. Hiermit konnte die Expression der Akt2 auf un-

gefähr 40 % Restexpression unterdrückt werden. Übertragen auf die Gesamt-Akt-Expression zeigte sich eine um 50 % reduzierte Abundanz der Akt. Rein rechnerisch würde sich daraus ein überaus hoher Anteil der Akt2 an der Akt-Gesamtexpression verglichen mit der Expression der anderen Isoformen ergeben. Es konnte gezeigt werden, dass die Genrepression der Akt2 in INS-1 Betazellen einen 2-fachen Anstieg der basalen und Zytokin-induzierten Apoptose bewirkt. Dieser Effekt konnte durch die verbleibenden zwei Isoformen der Akt nicht kompensiert werden, was die prominente Rolle der Akt2 hinsichtlich des Erhalts der Betazell-Masse unterstreicht. Dennoch blieb die Inhibition durch Glp-1-Mimetika verglichen mit der Basalsituation vollständig unverändert. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die Akt2 für die Glp-1-vermittelte anti-apoptotische Wirkung keine Rolle spielt. Um die Rolle der Akt in diesem Kontext vollständig zu klären, sollten die Isoformen 1 und 3 ebenfalls mittels siRNA reprimiert werden. Denkbar wäre auch ein gleichzeitiger *knockdown* aller Isoformen. Da allerdings zur Zeit keine validierten siRNAs dieser Isoformen in der Ratte kommerziell erhältlich sind, erweist sich dieser Ansatz als sehr zeitaufwändig.

### **4.5 Verstärkte anti-apoptotische Wirkung von Insulinanaloga durch Glp-1 Mimetika**

In einer Studie mit INS-1 Betazellen konnte die anti-apoptotische Wirkung einiger Insulinanaloga gegen Zytokin- und Fettsäure-induzierte Apoptose gezeigt werden [220]. Diese neue Eigenschaft von Insulinanaloga wird vermutlich, ähnlich wie bei IGF-1 [259], über IRS-2 und die Akt vermittelt. Da in primären Betazellen und in der Zelllinie INS-1 der IGF-Rezeptor stärker als der Insulin-Rezeptor exprimiert ist [260], liegt nahe, dass die antiapoptotische Wirkung der Insulinanaloga über diesen Rezeptor vermittelt wird, zumal einige Insulinanaloga eine verstärkte Bindung zu diesem Rezeptor

aufweisen [261]. Die IRS-2-Dysfunktion spielt bei der Pathogenese des Diabetes [262] und der Betazell-Apoptose [263] eine zentrale Rolle. IRS-2-*knockout*-Mäuse zeigen einen Phänotyp mit Charakteristika eines Typ-2-Diabetes und eine Reduktion ihrer Pankreasinseln um etwa 50 % [264]. Sollte nun die anti-apoptotische Wirkung von Glp-1 nicht über die Akt, sondern über die PKA vermittelt werden, wäre eine Verstärkung dieses Effekts durch Insulinanaloga denkbar. Interessanterweise wurde auch durch Glp-1 eine schwache IRS-2-Phosphorylierung nachgewiesen [255], unklar ist jedoch, ob dies eine Rolle für seine anti-apoptotische Wirkung spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von zwei Kurzzeit-(Insulin Glulisin und Lispro) und einem Langzeitanalogon (Glargin) gegen Zytokin- und Fettsäure-induzierte Apoptose untersucht. Alle drei Analoga waren zumindest im Fall der Zytokin-Behandlung in der Lage, die Wirkung von Glp-1RA signifikant zu verstärken. Im Fall der Fettsäure-induzierten Apoptose konnte lediglich Insulin Glargin einen verstärkten anti-apoptotischen Effekt erzielen. Möglicherweise liegt dies an der sechsfach stärkeren Bindung dieses Insulinanalogons an den IGF-1-Rezeptor [261]. Der additive Effekt zwischen Glp-1RA und Insulinanaloga unterstützt die Vermutung, dass Glp-1 seine anti-apoptotische Wirkung nicht über die Akt vermittelt. Allerdings wäre es auch möglich, dass die unterschiedlichen Wirkstoffe verschiedene Isoformen der Akt ansprechen. Dies müsste noch durch weitere Experimente geklärt werden.

Um den additiven Mechanismus von Glp-1RA und Insulinanaloga zu untersuchen, wurden sehr hohe Konzentrationen von Insulinanaloga verwendet. Dies diente dazu, die Wirkung von Glp-1 unter maximaler Stimulation des Akt-Signalweges zu beobachten. Bekanntermaßen wirken Insulinanaloga aber auch bei niedrigeren Konzentrationen (1 nM) anti-apoptotisch auf Betazellen [220].

Die verstärkte Wirkung von Glp-1RA und Insulinanaloga könnte eine neue therapeutische Möglichkeit zur Erhaltung der Betazell-Masse beim Diabetes mellitus darstellen. Ob sich diese Therapieform für den klinischen Einsatz eignet, werden weitere Untersu-



chungen an primären Pankreasinseln und am menschlichen Organismus zeigen müssen.

Der anti-apoptotische Effekt von Insulinanaloga ist allerdings auch kritisch zu hinterfragen, da durch die Hemmung von Apoptose auch das cancerogene Risiko dieser Wirkstoffe erhöht sein könnte. Gerade Insulin Glargin steht wegen seiner hohen Affinität zum IGF-1 Rezeptor im Fokus der Kritik, mitogene Effekte zu verursachen. Eine erste Studie wies das mitogene Potential von Insulin Glargin an der Osteosarkom-Zelllinie Saos/B10 nach [261]. In primären humanen Skelettmuskelzellen und koronararteriellen Endothelzellen und glatten Muskelzellen konnte allerdings keine erhöhte Steigerung der DNA-Synthese durch Insulin Glargin, verglichen mit humanem Insulin, festgestellt werden [265, 266]. Eine weitere Studie zeigte dagegen, dass sowohl verschiedene Insulinanaloga, als auch Insulin selbst proliferative Eigenschaften in koronararteriellen Fibroblasten und glatten Muskelzellen aufweisen. Allerdings sind diese Effekte abhängig vom jeweiligen Spender und vom Expressionsstatus von IGF-1R, Insulin-Rezeptor und IRS-1 [267]. Da Glp-1 und Exendin-4 Proliferation in pankreatischen Betazellen stimulieren, könnten diese Wirkstoffe auch das Wachstum von Pankreastumoren potentiell fördern. Eine Studie mit verschiedenen, den Glp-1-Rezeptor exprimierenden Pankreastumor-Zelllinien zeigte jedoch keine proliferativen oder anti-apoptotischen Effekte von Exendin-4 [268]. Andere Gewebe wurden bisher nicht auf mitogene Eigenschaften von Glp-1RA hin untersucht.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch die Untersuchung der anti-apoptotischen Wirkmechanismen von Glp-1-Mimetika die mitochondriale Atmungskette als Ziel dieser Stoffklasse gezeigt werden. Dies geht einher mit der Wirkung von Glp-1RA gegen oxidativen Stress. Der Akt-Signalweg wurde als Mechanismus für die anti-apoptotische Wirkung ausgeschlossen. Insulinanaloga verstärkten den Betazell-protektiven Effekt in der Kombination von Glp-1-Mimetika, was möglicherweise eine neue Therapieform zur Erhaltung der Betazellmasse im Diabetes darstellt.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Stoffwechselkrankheit Diabetes mellitus ist durch eine fortschreitende Zerstörung der insulinproduzierenden pankreatischen Betazellen charakterisiert. Beim Typ-1-Diabetes werden diese Zellen durch das körpereigene Immunsystem zerstört, beim Typ-2-Diabetes kommt es aufgrund einer peripheren Insulinresistenz zur Betazell-Dysfunktion, die schließlich ebenfalls in ihrer Zerstörung durch Apoptose mündet.

Neben seinen vielfältigen physiologischen Funktionen zeigt das *Glucagon-like peptide 1* einen positiven Effekt auf den Erhalt der Betazell-Masse durch Steigerung von Proliferation und Inhibition der Apoptose. Der Mechanismus der Glp-1-vermittelten anti-apoptotischen Wirkung ist bisher nicht vollständig aufgeklärt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde durch Einsatz der zweidimensionalen differentiellen Gelelektrophorese die Beteiligung der mitochondrialen Atmungskette an der Wirkung des Glp-1-Mimetikums Exendin-4 gegen Zytokin-induzierte Apoptose gezeigt. Die Beeinflussung einiger Schlüsselproteine der Atmungskette durch pro-inflammatorische Zytokine wurde durch Exendin-4 teilweise aufgehoben. Dies resultierte in einer Reduktion der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Die Ergebnisse lassen auch eine Wirkung von Exendin-4 auf den Verlauf von Zytokin-induziertem ER-Stress vermuten.

Durch siRNA-vermittelte Genrepression konnte gezeigt werden, dass die Akt nicht an der anti-apoptotischen Wirkung von Glp-1 beteiligt ist. Die Wirkung von Glp-1 und der Glp-1-Mimetika Exendin-4 und AVE0010 wurde durch die Kombination mit Insulinanaloga signifikant verstärkt. Diese Kombination könnte eine neue Therapieform zur Erhaltung der Betazell-Masse im Diabetes darstellen.

## SUMMARY

The metabolic disease Diabetes mellitus is characterised by progressive loss of insulin-producing pancreatic beta-cells. In type 1 diabetes, these cells are destructed by the organism's immune system, whereas type 2 diabetes is associated with peripheral insulin resistance which leads to beta cell dysfunction and apoptotic beta cell death.

Besides its numerous physiological functions, glucagon-like peptide 1 exhibits beneficial effects on the beta-cell mass by both enhancing proliferation and inhibiting apoptosis. However, the precise mechanisms of its antiapoptotic effect have remained elusive.

The participation of the mitochondrial respiratory chain on the action of exendin-4 against cytokine-induced apoptosis could be shown using two-dimensional differential gel electrophoresis. The regulation of some respiratory chain key proteins by pro-inflammatory cytokines were partially abolished by exendin-4. This led to reduced production of reactive oxygen species. Additionally, these results suggest also the action of exendin-4 against endoplasmic reticulum stress.

It could be shown by using siRNA-mediated gene knockdown that Akt signalling is not involved in the anti-apoptotic action of Glp-1. The action of Glp-1 and Glp-1 mimetics exendin-4 and AVE0010 was significantly enhanced by insulin analogues. This could represent a new therapeutic option for preservation of beta-cell mass in diabetes.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] WHITE, M. F.: The insulin signalling system and the IRS proteins. In: *Diabetologia* 40 (1997), S. S2–S17
- [2] REAVEN, G. M.: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. In: *Diabetes* 37 (1988), Nr. 12, S. 1595–1607
- [3] MODAN, M. ; HALKIN, H. ; ALMOG, S. ; LUSKY, A. ; ESHKOL, A. ; SHITRIT, M. Shefiand A. ; FUCHS, Z.: Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance. In: *J. Clin. Invest* 75 (1985), Nr. 3, S. 809–817
- [4] FERRANNINI, E. ; BUZZIGOLI, G. ; BONADONNA, R. ; GIORICO, M. A. ; M.OLEGGINI ; GRAZIADEI, L. ; PEDRINELLI, R. ; BRANDI, L. ; BEVILACQUA, S.: Insulin resistance in essential hypertension. In: *N. Engl. J. Med.* 317 (1987), Nr. 6, S. 350–357
- [5] REAVEN, G. M. ; LERNER, R. L. ; STERN, M. P. ; FARQUHAR, J. W.: Role of insulin in endogenous hypertriglyceridemia. In: *J. Clin. Invest* 46 (1967), Nr. 11, S. 1756–1767
- [6] OLEFSKY, J. ; REAVEN, G. M. ; FARQUHAR, J. W.: Effects of weight reduction on obesity. Studies of lipid and carbohydrate metabolism in normal and hyperlipoproteinemic subjects. In: *J. Clin. Invest* 53 (1974), Nr. 1, S. 64–76
- [7] HALLER, H.: [Epidemiology and associated risk factors of hyperlipoproteinemia]. In: *Z. Gesamte Inn. Med.* 32 (1977), Nr. 8, S. 124–128

- [8] SINGER, P.: [Diagnosis of primary hyperlipoproteinemias]. In: *Z. Gesamte Inn. Med.* 32 (1977), Nr. 8, S. 128
- [9] WARRAM, J. H. ; MARTIN, B. C. ; KROLEWSKI, A. S. ; R. KAHN, J. S. S.: Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. In: *Ann. Intern. Med.* 113 (1990), Nr. 12, S. 909–915
- [10] DUBOIS, M. ; VACHER, P. ; ROGER, B. ; HUYGHE, D. ; KERR-CONTE, B. V. ; PATTOU, F. ; MOUSSA, N. M. ; LANG, J.: Glucotoxicity inhibits late steps of insulin exocytosis. In: *Endocrinology* (2007)
- [11] SOLOMON, S. S. ; L. E. KING, Jr. ; HASHIMOTO, K.: Studies of the biological activity of insulin, cyclic nucleotides and concanavalin A in the isolated fat cell. In: *Horm. Metab Res.* 7 (1975), Nr. 4, S. 297–304
- [12] POITOUT, V. ; ROBERTSON, R. P.: Glucolipotoxicity: Fuel Excess and beta-Cell Dysfunction. In: *Endocr. Rev.* (2007)
- [13] YAMAGATA, K. ; FURUTA, H. ; ODA, N. ; KAISAKI, P. J. ; J. COX, S. M. ; FAJANS, S. S. ; SIGNORINI, S. ; STOFFEL, M. ; BELL, G. I.: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). In: *Nature* 384 (1996), Nr. 6608, S. 458–460
- [14] YAMAGATA, K. ; ODA, N. ; KAISAKI, P. J. ; MENZEL, S. ; VAXILLAIRE, H. F. ; SOUTHAM, L. ; COX, R. D. ; LATHROP, G. M. ; V. BORIRAJ, V. ; CHEN, X. ; COX, N. J. ; ODA, Y. ; YANO, H. ; YAMADA, M. M. Le Beau and S. ; NISHIGORI, H. ; TAKEDA, J. ; FAJANS, S. S. ; T. HATTERSLEY, A. ; IWASAKI, N. ; HANSEN, T. ; PEDERSEN, O. ; BELL, K. S. Polonsky and G. I. ; .: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). In: *Nature* 384 (1996), Nr. 6608, S. 455–458

- [15] STOFFERS, D. A. ; STANOJEVIC, V. ; HABENER, J. F.: Insulin promoter factor-1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein. In: *J. Clin. Invest* 102 (1998), Nr. 1, S. 232–241
- [16] HORIKAWA, Y. ; IWASAKI, N. ; HARA, M. ; FURUTA, H. ; N. COCKBURN, Y. H. ; LINDNER, T. ; YAMAGATA, K. ; OGATA, M. ; KUROKI, O. Tomonagaand H. ; KASAHARA, T. ; IWAMOTO, Y. ; BELL, G. I.: Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. In: *Nat. Genet.* 17 (1997), Nr. 4, S. 384–385
- [17] MALECKI, M. T. ; JHALA, U. S. ; ANTONELLIS, A. ; FIELDS, L. ; ORBAN, A. Doriaand T. ; SAAD, M. ; WARRAM, J. H. ; MONTMINY, M. ; KROLEWSKI, A. S.: Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. In: *Nat. Genet.* 23 (1999), Nr. 3, S. 323–328
- [18] FROGUEL, P. ; VAXILLAIRE, M. ; SUN, F. ; VELHO, G. ; ZOUALI, H. ; BUTEL, M.O. ; LESAGE, S. ; VIONNET, N. ; CLEMENT, K. ; .. F. F.: Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. In: *Nature* 356 (1992), Nr. 6365, S. 162–164
- [19] KOSTER, I. ; FERBER, L. von ; IHLE, P. ; SCHUBERT, I. ; HAUNER, H.: The cost burden of diabetes mellitus: the evidence from Germany—the CoDiMstudy. In: *Diabetologia* 49 (2006), Nr. 7, S. 1498–1504
- [20] GORES, G. J. ; HERMAN, B. ; LEMASTERS, J. J.: Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. In: *Hepatology* 11 (1990), Nr. 4, S. 690–698
- [21] HASLETT, C.: Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. In: *Clin. Sci. (Lond)* 83 (1992), Nr. 6, S. 639–648

- [22] KERR, J. F. ; WYLLIE, A. H. ; CURRIE, A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *Br. J. Cancer* 26 (1972), Nr. 4, S. 239–257
- [23] CORY, S. ; ADAMS, J. M.: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. In: *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002), Nr. 9, S. 647–656
- [24] CORY, S. ; HUANG, D. C. ; ADAMS, J. M.: The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. In: *Oncogene* 22 (2003), Nr. 53, S. 8590–8607
- [25] FADOK, V. A. ; VOELKER, D. R. ; CAMPBELL, P. A. ; COHEN, J. J. ; BRATTON, D.L. ; HENSON, P. M.: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. In: *J. Immunol.* 148 (1992), Nr. 7, S. 2207–2216
- [26] THORNBERRY, N. A. ; LAZEBNIK, Y.: Caspases: enemies within. In: *Science* 281 (1998), Nr. 5381, S. 1312–1316
- [27] STRASSER, A. ; O'CONNOR, L. ; DIXIT, V. M.: Apoptosis signaling. In: *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000), S. 217–245
- [28] ASHKENAZI, A. ; DIXIT, V. M.: Death receptors: signaling and modulation. In: *Science* 281 (1998), Nr. 5381, S. 1305–1308
- [29] WALKER, N. P. ; TALANIAN, R. V. ; BRADY, K. D. ; DANG, L. C. ; J.BUMP, N. ; FERENZ, C. R. ; FRANKLIN, S. ; GHAYUR, T. ; D. HAMMILL, M. C. H. ; .: Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. In: *Cell* 78 (1994), Nr. 2, S. 343–352
- [30] WILSON, K. P. ; BLACK, J. A. ; THOMSON, J. A. ; KIM, E. E. ; NAVIA, J. P. Griffith and M. A. ; MURCKO, M. A. ; CHAMBERS, S. P. ; A. RAYBUCK, R. A. A. ; .: Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. In: *Nature* 370 (1994), Nr. 6487, S. 270–275

- [31] ROTONDA, J. ; NICHOLSON, D. W. ; FAZIL, K. M. ; GALLANT, M. ; LABELLE, Y. Gareauand M. ; PETERSON, E. P. ; RASPER, D. M. ; RUEL, R. ; P.VAILLANCOURT, J. ; THORNBERRY, N. A. ; BECKER, J. W.: The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. In: *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996), Nr. 7, S. 619–625
- [32] NICHOLSON, D. W. ; THORNBERRY, N. A.: Caspases: killer proteases. In: *Trends Biochem. Sci.* 22 (1997), Nr. 8, S. 299–306
- [33] ENARI, M. ; SAKAHIRA, H. ; YOKOYAMA, H. ; OKAWA, K. ; NAGATA, A. I.: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. In: *Nature* 391 (1998), Nr. 6662, S. 43–50
- [34] SAKAHIRA, H. ; ENARI, M. ; NAGATA, S.: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. In: *Nature* 391 (1998), Nr. 6662, S. 96–99
- [35] RUDEL, T. ; BOKOCH, G. M.: Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. In: *Science* 276 (1997), Nr. 5318, S. 1571–1574
- [36] HOFMANN, K. ; BUCHER, P. ; TSCHOPP, J.: The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. In: *Trends Biochem. Sci.* 22 (1997), Nr. 5, S. 155–156
- [37] BOLDIN, M. P. ; VARFOLOMEEV, E. E. ; PANCER, Z. ; METT, I. L. ; H.CAMONIS, J. ; WALLACH, D.: A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. In: *J. Biol. Chem.* 270 (1995), Nr. 14, S. 7795–7798
- [38] MEDEMA, J. P. ; SCAFFIDI, C. ; KISCHKEL, F. C. ; SHEVCHENKO, A. ; M.MANN ; KRAMMER, P. H. ; PETER, M. E.: FLICE



- is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). In: *EMBO J.* 16 (1997), Nr. 10, S. 2794–2804
- [39] ACEHAN, D. ; JIANG, X. ; MORGAN, D. G. ; HEUSER, J. E. ; W. AKEY, X. W.: Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. In: *Mol. Cell* 9 (2002), Nr. 2, S. 423–432
- [40] CHITTENDEN, T. ; FLEMINGTON, C. ; HOUGHTON, A. B. ; EBB, R. G. ; GALLO, G.J. ; ELANGOVAN, B. ; CHINNADURAI, G. ; LUTZ, R. J.: A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. In: *EMBO J.* 14 (1995), Nr. 22, S. 5589–5596
- [41] KELEKAR, A. ; THOMPSON, C. B.: Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. In: *Trends Cell Biol.* 8 (1998), Nr. 8, S. 324–330
- [42] BURLACU, A.: Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. In: *J. Cell Mol. Med.* 7 (2003), Nr. 3, S. 249–257
- [43] OLTVAI, Z. N. ; MILLIMAN, C. L. ; KORSMEYER, S. J.: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. In: *Cell* 74 (1993), Nr. 4, S. 609–619
- [44] NAGATA, S.: Apoptosis by death factor. In: *Cell* 88 (1997), Nr. 3, S. 355–365
- [45] WALLACH, D. ; KOVALENKO, A. V. ; VARFOLOMEEV, E. E. ; BOLDIN, M. P.: Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. In: *Curr. Opin. Immunol.* 10 (1998), Nr. 3, S. 279–288
- [46] CROOK, N. E. ; CLEM, R. J. ; MILLER, L. K.: An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. In: *J. Virol.* 67 (1993), Nr. 4, S. 2168–2174

- [47] BIRNBAUM, M. J. ; CLEM, R. J. ; MILLER, L. K.: An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. In: *J. Virol.* 68 (1994), Nr. 4, S. 2521–2528
- [48] ROTHE, M. ; PAN, M. G. ; HENZEL, W. J. ; AYRES, T. M. ; GOEDDEL, D. V.: The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. In: *Cell* 83 (1995), Nr. 7, S. 1243–1252
- [49] DUCKETT, C. S. ; NAVA, V. E. ; GEDRICH, R. W. ; CLEM, R. J. ; DONGEN, J. L. ; GILFILLAN, M. C. ; SHIELS, H. ; HARDWICK, J. M. ; THOMPSON, C.B.: A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. In: *EMBO J.* 15 (1996), Nr. 11, S. 2685–2694
- [50] LISTON, P. ; ROY, N. ; TAMAI, K. ; LEFEBVRE, C. ; BAIRD, S. ; FARAHANI, G. ; Cherton-Horvat and R. ; MCLEAN, M. ; IKEDA, J. E. ; MACKENZIE, A. ; G. KORNELUK, R.: Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. In: *Nature* 379 (1996), Nr. 6563, S. 349–353
- [51] VUCIC, D. ; STENNICKE, H. R. ; PISABARRO, M. T. ; DIXIT, G. S. S.: ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. In: *Curr. Biol.* 10 (2000), Nr. 21, S. 1359–1366
- [52] AMBROSINI, G. ; ADIDA, C. ; ALTIERI, D. C.: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. In: *Nat. Med.* 3 (1997), Nr. 8, S. 917–921
- [53] HAUSER, H. P. ; BARDROFF, M. ; PYROWOLAKIS, G. ; JENTSCH, S.: A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. In: *J. Cell Biol.* 141 (1998), Nr. 6, S. 1415–1422
- [54] ROY, N. ; DEVERAUX, Q. L. ; TAKAHASHI, R. ; SALVESEN, G. S. ; C. REED, J.: The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct

- inhibitors of specific caspases. In: *EMBO J.* 16 (1997), Nr. 23, S. 6914–6925
- [55] DEVERAUX, Q. L. ; TAKAHASHI, R. ; SALVESEN, G. S. ; REED, J. C.: X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. In: *Nature* 388 (1997), Nr. 6639, S. 300–304
- [56] DEVERAUX, Q. L. ; ROY, N. ; STENNICKE, H. R. ; ARSDALE, T. V. ; Q.ZHOU ; SRINIVASULA, S. M. ; ALNEMRI, E. S. ; SALVESEN, G. S. ; REED, J.C.: IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. In: *EMBO J.* 17 (1998), Nr. 8, S. 2215–2223
- [57] TAKAHASHI, R. ; DEVERAUX, Q. ; TAMM, I. ; WELSH, K. ; S. SALVESEN, N. Assa-Munt and G. ; REED, J. C.: A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. In: *J. Biol. Chem.* 273 (1998), Nr. 14, S. 7787–7790
- [58] TAMM, I. ; WANG, Y. ; SAUSVILLE, E. ; SCUDIERO, D. A. ; OLTERS DORF, N. V. ; REED, J. C.: IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. In: *Cancer Res.* 58 (1998), Nr. 23, S. 5315–5320
- [59] KISCHKEL, F. C. ; HELLBARDT, S. ; BEHRMANN, I. ; GERMER, M. ; KRAMMER, M. Pawlita and P. H. ; PETER, M. E.: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. In: *EMBO J.* 14 (1995), Nr. 22, S. 5579–5588
- [60] MUZIO, M. ; STOCKWELL, B. R. ; STENNICKE, H. R. ; M. DIXIT, G. S. S.: An induced proximity model for caspase-8 activation. In: *J. Biol. Chem.* 273 (1998), Nr. 5, S. 2926–2930
- [61] GROSS, A. ; YIN, X. M. ; WANG, K. ; WEI, M. C. ; JOCKEL, J. ; ERDJUMENT-BROMAGE, C. Milliman and H. ; TEMPST,

- P. ; KORSMEYER, S. J.: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fasdeath. In: *J. Biol. Chem.* 274 (1999), Nr. 2, S. 1156–1163
- [62] NEWMAYER, D. D. ; FARSCHEON, D. M. ; REED, J. C.: Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. In: *Cell* 79 (1994), Nr. 2, S. 353–364
- [63] HSU, Y. T. ; WOLTER, K. G. ; YOULE, R. J.: Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94 (1997), Nr. 8, S. 3668–3672
- [64] ANTONSSON, B. ; MONTESSUIT, S. ; SANCHEZ, B. ; MARTINO, J. C.: Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. In: *J. Biol. Chem.* 276 (2001), Nr. 15, S. 11615–11623
- [65] NECHUSHTAN, A. ; SMITH, C. L. ; LAMENSDORF, I. ; YOON, S. H. ; J. YOULE, R.: Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. In: *J. Cell Biol.* 153 (2001), Nr. 6, S. 1265–1276
- [66] GRIFFITHS, G. J. ; DUBREZ, L. ; MORGAN, C. P. ; JONES, N. A. ; CORFE, J. Whitehouse and B. M. ; DIVE, C. ; HICKMAN, J. A.: Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. In: *J. Cell Biol.* 144 (1999), Nr. 5, S. 903–914
- [67] WEI, M. C. ; LINDSTEN, T. ; MOOTHA, V. K. ; WEILER, S. ; ASHIYA, A. G. ; THOMPSON, C. B. ; KORSMEYER, S. J.: tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. In: *Genes Dev.* 14 (2000), Nr. 16, S. 2060–2071

- [68] CROMPTON, M.: On the involvement of mitochondrial intermembrane junctional complexes in apoptosis. In: *Curr. Med. Chem.* 10 (2003), Nr. 16, S. 1473–1484
- [69] MADESH, M. ; HAJNOCZKY, G.: VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. In: *J. Cell Biol.* 155 (2001), Nr. 6, S. 1003–1015
- [70] GREEN, D. R. ; EVAN, G. I.: A matter of life and death. In: *Cancer Cell* 1 (2002), Nr. 1, S. 19–30
- [71] WANG, X.: The expanding role of mitochondria in apoptosis. In: *Genes Dev.* 15 (2001), Nr. 22, S. 2922–2933
- [72] SLEE, E. A. ; HARTE, M. T. ; KLUCK, R. M. ; WOLF, B. B. ; NEUMEYER, C. A. Casiano and D. D. ; WANG, H. G. ; REED, J. C. ; S. ALNEMRI, D. W. N. ; GREEN, D. R. ; MARTIN, S. J.: Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. In: *J. Cell Biol.* 144 (1999), Nr. 2, S. 281–292
- [73] MODJTAHEDI, N. ; GIORDANETTO, F. ; MADEO, F. ; KROEMER, G.: Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. In: *Trends Cell Biol.* 16 (2006), Nr. 5, S. 264–272
- [74] OKADA, H. ; SUH, W. K. ; JIN, J. ; WOO, M. ; DU, C. ; ELIA, A. ; DUNCAN, G.S. ; WAKEHAM, A. ; ITIE, A. ; LOWE, S. W. ; WANG, X. ; MAK, T.W.: Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice. In: *Mol. Cell Biol.* 22 (2002), Nr. 10, S. 3509–3517
- [75] VERHAGEN, A. M. ; EKERT, P. G. ; PAKUSCH, M. ; SILKE, J. ; REID, L. M. Connolly and G. E. ; MORITZ, R. L. ; SIMPSON, R. J. ; VAUX, D. L.: Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. In: *Cell* 102 (2000), Nr. 1, S. 43–53

- [76] LOO, G. van ; GURP, M. van ; DEPUYDT, B. ; SRINIVASULA, S. M. ; ALNEMRI, I. Rodriguezand E. S. ; GEVAERT, K. ; VAN-DEKERCKHOVE, J. ; VANDENABEELE, W. Declercqand P.: The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis.Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspaseactivity. In: *Cell Death. Differ.* 9 (2002), Nr. 1, S. 20–26
- [77] MOOTHA, V. K. ; WEI, M. C. ; BUTTLE, K. F. ; SCORRANO, L. ; MANNELLA, V. Panoutsakopoulouand C. A. ; KORSMEYER, S. J.: A reversible component of mitochondrial respiratory dysfunction in apoptosiscan be rescued by exogenous cytochrome c. In: *EMBO J.* 20 (2001), Nr. 4, S. 661–671
- [78] TURRENS, J. F. ; BOVERIS, A.: Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heartmitochondria. In: *Biochem. J.* 191 (1980), Nr. 2, S. 421–427
- [79] LIU, Y. ; FISKUM, G. ; SCHUBERT, D.: Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transportchain. In: *J. Neurochem.* 80 (2002), Nr. 5, S. 780–787
- [80] ZHANG, Y. ; MARCILLAT, O. ; GIULIVI, C. ; ERNSTER, L. ; DAVIES, K. J.: The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain componentsand ATPase. In: *J. Biol. Chem.* 265 (1990), Nr. 27, S. 16330–16336
- [81] IVERSON, S. L. ; ORRENIUS, S.: The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulationof apoptosis. In: *Arch. Biochem. Biophys.* 423 (2004), Nr. 1, S. 37–46
- [82] SUZUKI, Y. ; ONO, Y. ; HIRABAYASHI, Y.: Rapid and specific reactive oxygen species generation via NADPH oxidaseactivation during Fas-mediated apoptosis. In: *FEBS Lett.* 425 (1998), Nr. 2, S. 209–212
- [83] GOTTLIEB, E. ; HEIDEN, M. G. V. ; THOMPSON, C. B.: Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane

- potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. In: *Mol. Cell Biol.* 20 (2000), Nr. 15, S. 5680–5689
- [84] TIRASOPHON, W. ; WELIHINDA, A. A. ; KAUFMAN, R. J.: A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. In: *Genes Dev.* 12 (1998), Nr. 12, S. 1812–1824
- [85] IWAWAKI, T. ; HOSODA, A. ; OKUDA, T. ; KAMIGORI, Y. ; KIMATA, C. ; Nomura-Furuwatari and Y. ; TSURU, A. ; KOHNO, K.: Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. In: *Nat. Cell Biol.* 3 (2001), Nr. 2, S. 158–164
- [86] BREWER, J. W. ; DIEHL, J. A.: PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000), Nr. 23, S. 12625–12630
- [87] HAZE, K. ; YOSHIDA, H. ; YANAGI, H. ; YURA, T. ; MORI, K.: Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. In: *Mol. Biol. Cell* 10 (1999), Nr. 11, S. 3787–3799
- [88] OAKES, S. A. ; OPFERMAN, J. T. ; POZZAN, T. ; KORSMEYER, S. J. ; L. SCORRANO: Regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> dynamics by proapoptotic BCL-2 family members. In: *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003), Nr. 8, S. 1335–1340
- [89] SCORRANO, L. ; OAKES, S. A. ; OPFERMAN, J. T. ; CHENG, E. H. ; D. SORCINELLI, M. ; POZZAN, T. ; KORSMEYER, S. J.: BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. In: *Science* 300 (2003), Nr. 5616, S. 135–139

- [90] NUTT, L. K. ; PATAER, A. ; PAHLER, J. ; FANG, B. ; ROTH, J. ; J.McCONKEY, D. ; SWISHER, S. G.: Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrialCa<sup>2+</sup> stores. In: *J. Biol. Chem.* 277 (2002), Nr. 11, S. 9219–9225
- [91] ZONG, W. X. ; LI, C. ; HATZIVASSILIOU, G. ; LINDSTEN, T. ; YUAN, Q. C. Yuand J. ; THOMPSON, C. B.: Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. In: *J. Cell Biol.* 162 (2003), Nr. 1, S. 59–69
- [92] BOATRIGHT, K. M. ; RENATUS, M. ; SCOTT, F. L. ; SPERANDIO, S. ; PEDERSEN, H. Shinand I. M. ; RICCI, J. E. ; EDRIS, W. A. ; GREEN, D. P. Sutherlinand D. R. ; SALVESEN, G. S.: A unified model for apical caspase activation. In: *Mol. Cell* 11 (2003), Nr. 2, S. 529–541
- [93] YONEDA, T. ; IMAIZUMI, K. ; OONO, K. ; YUI, D. ; GOMI, F. ; TOHYAMA, T. Katayamaand M.: Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase,through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. In: *J. Biol. Chem.* 276 (2001), Nr. 17, S. 13935–13940
- [94] DICKSON, L. M. ; RHODES, C. J.: Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes:a role for protein kinase B in the Akt? In: *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 287 (2004), Nr. 2, S. E192–E198
- [95] BONNER-WEIR, S.: Life and death of the pancreatic beta cells. In: *Trends Endocrinol. Metab* 11 (2000), Nr. 9, S. 375–378
- [96] FINEGOOD, D. T. ; SCAGLIA, L. ; BONNER-WEIR, S.: Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. In: *Diabetes* 44 (1995), Nr. 3, S. 249–256



- [97] SORENSON, R. L. ; BRELJE, T. C.: Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. In: *Horm. Metab Res.* 29 (1997), Nr. 6, S. 301–307
- [98] BONNER-WEIR, S.: Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. In: *Endocrinology* 141 (2000), Nr. 6, S. 1926–1929
- [99] BUTLER, A. E. ; JANSON, J. ; BONNER-WEIR, S. ; RITZEL, R. ; BUTLER, R. A. Rizza and P. C.: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. In: *Diabetes* 52 (2003), Nr. 1, S. 102–110
- [100] UNGER, R. H. ; ORCI, L.: Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. In: *FASEB J.* 15 (2001), Nr. 2, S. 312–321
- [101] LINGOHR, M. K. ; BUETTNER, R. ; RHODES, C. J.: Pancreatic beta-cell growth and survival—a role in obesity-linked type 2 diabetes? In: *Trends Mol. Med.* 8 (2002), Nr. 8, S. 375–384
- [102] PICK, A. ; CLARK, J. ; KUBSTRUP, C. ; LEVISETTI, M. ; PUGH, W. ; S. BONNER-WEIR ; POLONSKY, K. S.: Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. In: *Diabetes* 47 (1998), Nr. 3, S. 358–364
- [103] JAIKARAN, E. T. ; CLARK, A.: Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1537 (2001), Nr. 3, S. 179–203
- [104] WEIR, G. C. ; BONNER-WEIR, S.: Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. In: *Diabetes* 53 Suppl 3 (2004), S. S16–S21
- [105] DONATH, M. Y. ; HALBAN, P. A.: Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. In: *Diabetologia* 47 (2004), Nr. 3, S. 581–589

- [106] DONATH, M. Y. ; STORLING, J. ; MAEDLER, K. ; MANDRUP-POULSEN, T.: Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. In: *J. Mol. Med.* 81 (2003), Nr. 8, S. 455–470
- [107] BONNER-WEIR, S. ; DEERY, D. ; LEAHY, J. L. ; WEIR, G. C.: Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. In: *Diabetes* 38 (1989), Nr. 1, S. 49–53
- [108] CHICK, W. L. ; LIKE, A. A.: Studies in the diabetic mutant mouse. 3. Physiological factors associated with alterations in beta cell proliferation. In: *Diabetologia* 6 (1970), Nr. 3, S. 243–251
- [109] DONATH, M. Y. ; GROSS, D. J. ; CERASI, E. ; KAISER, N.: Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of Psammomysobesus during development of diabetes. In: *Diabetes* 48 (1999), Nr. 4, S. 738–744
- [110] EFANOVA, I. B. ; ZAITSEV, S. V. ; ZHIVOTOVSKY, B. ; KOHLER, M. ; S.EFENDIC ; ORRENIUS, S. ; BERGGREN, P. O.: Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. A process dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. In: *J. Biol. Chem.* 273 (1998), Nr. 50, S. 33501–33507
- [111] HOORENS, A. ; DE, Castele M. V. ; KLOPPEL, G. ; PIPELEERS, D.: Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. In: *J. Clin. Invest* 98 (1996), Nr. 7, S. 1568–1574
- [112] MAEDLER, K. ; SPINAS, G. A. ; LEHMANN, R. ; SERGEEV, P. ; FONTANA, M. W. ; KAISER, N. ; DONATH, M. Y.: Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. In: *Diabetes* 50 (2001), Nr. 8, S. 1683–1690

- [113] FEDERICI, M. ; HRIBAL, M. ; PEREGO, L. ; RANALLI, M. ; PEREGO, Z. Caradonnaand C. ; USELLINI, L. ; NANO, R. ; BONINI, P. ; MARLIER, F. Bertuzziand L. N. ; DAVALLI, A. M. ; CARANDENTE, O. ; MELINO, A. E. Pontiroliand G. ; MARCHETTI, P. ; LAURO, R. ; SESTI, G. ; FOLLI, F.: High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans:a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward anapoptotic cell death program. In: *Diabetes* 50 (2001), Nr. 6, S. 1290–1301
- [114] GHISELLI, A. ; LAURENTI, O. ; MATTIA, G. D. ; MAIANI, G. ; FERRO-LUZZI, A.: Salicylate hydroxylation as an early marker of in vivo oxidative stressin diabetic patients. In: *Free Radic. Biol. Med.* 13 (1992), Nr. 6, S. 621–626
- [115] GOPAUL, N. K. ; ANGGARD, E. E. ; MALLET, A. I. ; P. WOLFF, D. J. B. ; NOUROOZ-ZADEH, J.: Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulindependent diabetes mellitus. In: *FEBS Lett.* 368 (1995), Nr. 2, S. 225–229
- [116] NOUROOZ-ZADEH, J. ; GOPAUL, N. K. ; BARROW, S. ; MALLET, A. I. ; ANGGARD, E.E.: Analysis of F2-isoprostanes as indicators of non-enzymatic lipid peroxidationin vivo by gas chromatography-mass spectrometry: development of a solid-phaseextraction procedure. In: *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 667 (1995), Nr. 2, S. 199–208
- [117] REHMAN, A. ; NOUROOZ-ZADEH, J. ; MOLLER, W. ; TRITSCHLER, H. ; HALLIWELL, P. Pereiraand B.: Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes-mellitus. In: *FEBS Lett.* 448 (1999), Nr. 1, S. 120–122
- [118] SHIN, C. S. ; MOON, B. S. ; PARK, K. S. ; KIM, S. Y. ; H. CHUNG, S. J. P. ; LEE, H. K.: Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. In: *Diabetes Care* 24 (2001), Nr. 4, S. 733–737

- [119] SAKURABA, H. ; MIZUKAMI, H. ; YAGIHASHI, N. ; WADA, R. ; YAGIHASHI, C. H.: Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. In: *Diabetologia* 45 (2002), Nr. 1, S. 85–96
- [120] GRANKVIST, K. ; MARKLUND, S. L. ; TALJEDAL, I. B.: CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathioneperoxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. In: *Biochem. J.* 199 (1981), Nr. 2, S. 393–398
- [121] TIEDGE, M. ; LORTZ, S. ; MUNDAY, R. ; LENZEN, S.: Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. In: *Diabetes* 47 (1998), Nr. 10, S. 1578–1585
- [122] ROBERTSON, R. P.: Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. In: *J. Biol. Chem.* 279 (2004), Nr. 41, S. 42351–42354
- [123] DU, X. L. ; EDELSTEIN, D. ; ROSSETTI, L. ; FANTUS, I. G. ; ZIYADEH, H. ; GOLDBERG, F. ; WU, J. ; BROWNLEE, M.: Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000), Nr. 22, S. 12222–12226
- [124] MAEDLER, K. ; SERGEEV, P. ; RIS, F. ; OBERHOLZER, J. ; SPINAS, H. I. ; JOLLER-JEMELKA, G. A. ; KAISER, N. ; HALBAN, P. A. ; DONATH, M. Y.: Glucose-induced beta cell production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. In: *J. Clin. Invest.* 110 (2002), Nr. 6, S. 851–860

- [125] MAEDLER, K. ; FONTANA, A. ; RIS, F. ; SERGEEV, P. ; TOSO, C. ; LEHMANN, J. Oberholzer and R. ; BACHMANN, F. ; TASINATO, A. ; SPINAS, G. A. ; HALBAN, P.A. ; DONATH, M. Y.: FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human pancreatic beta cells from apoptosis to cell replication. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99 (2002), Nr. 12, S. 8236–8241
- [126] ELOUIL, H. ; BENSELLAM, M. ; GUIOT, Y. ; VANDER, Mierde D. ; SCHUIT, S. M. Pascal and F. C. ; JONAS, J. C.: Acute nutrient regulation of the unfolded protein response and integrated stress response in cultured rat pancreatic islets. In: *Diabetologia* 50 (2007), Nr. 7, S. 1442–1452
- [127] MAEDLER, K. ; SPINAS, G. A. ; DYNTER, D. ; MORITZ, W. ; DONATH, N. K.: Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. In: *Diabetes* 50 (2001), Nr. 1, S. 69–76
- [128] MAEDLER, K. ; OBERHOLZER, J. ; BUCHER, P. ; SPINAS, G. A. ; DONATH, M. Y.: Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. In: *Diabetes* 52 (2003), Nr. 3, S. 726–733
- [129] ASSAAD, W. E. ; BUTEAU, J. ; PEYOT, M. L. ; NOLAN, C. ; HARDY, R. R. ; JOLY, E. ; DBAIBO, G. ; ROSENBERG, L. ; PRENTKI, M.: Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. In: *Endocrinology* 144 (2003), Nr. 9, S. 4154–4163
- [130] EITEL, K. ; STAIGER, H. ; BRENDEL, M. D. ; BRANDHORST, D. ; HARING, R. G. Bretzel and H. U. ; KELLERER, M.: Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299 (2002), Nr. 5, S. 853–856

- [131] CNOP, M. ; HANNAERT, J. C. ; HOORENS, A. ; EIZIRIK, D. L. ; PIPELEERS, D. G.: Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. In: *Diabetes* 50 (2001), Nr. 8, S. 1771–1777
- [132] LISTENBERGER, L. L. ; HAN, X. ; LEWIS, S. E. ; CASES, S. ; R. V. FARESE, Jr. ; ORY, D. S. ; SCHAFFER, J. E.: Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 (2003), Nr. 6, S. 3077–3082
- [133] SHIMABUKURO, M. ; ZHOU, Y. T. ; LEVI, M. ; UNGER, R. H.: Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95 (1998), Nr. 5, S. 2498–2502
- [134] LUPI, R. ; DOTTA, F. ; MARSELLI, L. ; GUERRA, S. D. ; SANTANGELO, M. M. ; PATANE, G. ; BOGGI, U. ; PIRO, S. ; BERGAMINI, M. A. ; MOSCA, F. ; MARIO, U. D. ; PRATO, S. D. ; MARCHETTI, P.: Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase-mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. In: *Diabetes* 51 (2002), Nr. 5, S. 1437–1442
- [135] SHIMABUKURO, M. ; HIGA, M. ; ZHOU, Y. T. ; WANG, M. Y. ; UNGER, C. B. Newgard and R. H.: Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. In: *J. Biol. Chem.* 273 (1998), Nr. 49, S. 32487–32490
- [136] RODUIT, R. ; MORIN, J. ; MASSE, F. ; SEGALL, L. ; ROCHE, E. ; B. NEWGARD, C. ; ASSIMACOPOULOS-JEANNET, F. ; PRENTKI, M.: Glucose down-regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene in the pan-

- creatic beta -cell. In: *J. Biol. Chem.* 275 (2000), Nr. 46, S. 35799–35806
- [137] RUDERMAN, N. ; PRENTKI, M.: AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. In: *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004), Nr. 4, S. 340–351
- [138] PIRO, S. ; ANELLO, M. ; PIETRO, C. D. ; LIZZIO, M. N. ; M. RABUAZZO, G. P. ; VIGNERI, R. ; PURRELLO, M. ; PURRELLO, F.: Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress. In: *Metabolism* 51 (2002), Nr. 10, S. 1340–1347
- [139] MAESTRE, I. ; JORDAN, J. ; CALVO, S. ; REIG, J. A. ; CENA, V. ; B.SORIA ; PRENTKI, M. ; ROCHE, E.: Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1. In: *Endocrinology* 144 (2003), Nr. 1, S. 335–345
- [140] WANG, X. ; LI, H. ; LEO, D. D. ; GUO, W. ; KOSHKIN, V. ; GIACCA, I. G. Fantus and A. ; CHAN, C. B. ; DER, S. ; WHEELER, M. B.: Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen species-associated lipotoxicity in the pancreatic beta-cell line MIN6. In: *Diabetes* 53 (2004), Nr. 1, S. 129–140
- [141] MORGAN, D. ; OLIVEIRA-EMILIO, H. R. ; KEANE, D. ; HIRATA, A. E. ; SANTOS da R. ; BORDIN, S. ; CURI, R. ; NEWSHOLME, P. ; CARPINELLI, A. R.: Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. In: *Diabetologia* 50 (2007), Nr. 2, S. 359–369
- [142] KHARROUBI, I. ; LADRIERE, L. ; CARDOZO, A. K. ; DOGUSAN, Z. ; EIZIRIK, M. Cnop and D. L.: Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reti-

- culumstress. In: *Endocrinology* 145 (2004), Nr. 11, S. 5087–5096
- [143] KARASKOV, E. ; SCOTT, C. ; ZHANG, L. ; TEODORO, T. ; VOLCHUK, M. R.: Chronic Palmitate but not Oleate Exposure Induces Endoplasmic Reticulum Stress Which May Contribute to INS-1 Pancreatic beta-cell Apoptosis. In: *Endocrinology* (2006)
- [144] LAYBUTT, D. R. ; PRESTON, A. M. ; AKERFELDT, M. C. ; K. BUSCH, J. G. K. ; BIANKIN, A. V. ; BIDEN, T. J.: Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type2 diabetes. In: *Diabetologia* 50 (2007), Nr. 4, S. 752–763
- [145] MANDRUP-POULSEN, T.: The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. In: *Diabetologia* 39 (1996), Nr. 9, S. 1005–1029
- [146] EIZIRIK, D. L. ; MANDRUP-POULSEN, T.: A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated beta-cellapoptosis. In: *Diabetologia* 44 (2001), Nr. 12, S. 2115–2133
- [147] WESCHE, H. ; KORHERR, C. ; KRACHT, M. ; FALK, W. ; RESCH, K. ; U.MARTIN, M.: The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). In: *J. Biol. Chem.* 272 (1997), Nr. 12, S. 7727–7731
- [148] WESCHE, H. ; HENZEL, W. J. ; SHILLINGLAW, W. ; LI, S. ; CAO, Z.: MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. In: *Immunity.* 7 (1997), Nr. 6, S. 837–847
- [149] GILMORE, T. D.: The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. In: *Oncogene* 18 (1999), Nr. 49, S. 6842–6844



- [150] LARSEN, C. M. ; WADT, K. A. ; JUHL, L. F. ; ANDERSEN, H. U. ; E.KARLSEN, A. ; SU, M. S. ; SEEDORF, K. ; SHAPIRO, L. ; MANDRUP-POULSEN, C. A. Dinarelloand T.: Interleukin-1beta-induced rat pancreatic islet nitric oxide synthesis requiresboth the p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activatedprotein kinases. In: *J. Biol. Chem.* 273 (1998), Nr. 24, S. 15294–15300
- [151] ABDELLI, S. ; ABDERRAHMANI, A. ; HERING, B. J. ; BECKMANN, J. S. ; C.BONNY: The c-Jun N-terminal kinase JNK participates in cytokine- and isolationstress-induced rat pancreatic islet apoptosis. In: *Diabetologia* 50 (2007), Nr. 8, S. 1660–1669
- [152] HARTMAN, M. G. ; LU, D. ; KIM, M. L. ; KOCIBA, G. J. ; BUTEAU, T. S. ; WANG, X. ; FRANKEL, W. L. ; GUTTRIDGE, D. ; GREY, M. Prentkiand S. T. ; RON, D. ; HAI, T.: Role for activating transcription factor 3 in stress-induced beta-cell apoptosis. In: *Mol. Cell Biol.* 24 (2004), Nr. 13, S. 5721–5732
- [153] OYADOMARI, S. ; TAKEDA, K. ; TAKIGUCHI, M. ; GOTOH, T. ; WADA, M. Matsumotoand I. ; AKIRA, S. ; ARAKI, E. ; MORI, M.: Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by theendoplasmic reticulum stress pathway. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98 (2001), Nr. 19, S. 10845–10850
- [154] CARDOZO, A. K. ; ORTIS, F. ; STORLING, J. ; FENG, Y. M. ; TONNESEN, J. Rasschaertand M. ; EYLEN, F. V. ; MANDRUP-POULSEN, T. ; EIZIRIK, A. Herchuelzand D. L.: Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca<sup>2+</sup> AT-Pase 2band deplete endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>, leading to induction of endoplasmicreticulum stress in pancreatic beta-cells. In: *Diabetes* 54 (2005), Nr. 2, S. 452–461
- [155] EHSES, J. A. ; PERREN, A. ; EPPLER, E. ; RIBAU, P. ; MAORCAHN, J. A. Pospisilikand R. ; GUERPEL, X. ; ELLINGSGAARD,

- H. ; BIOLLAZ, M. K. Schneider and G. ; FONTANA, A. ; REINCKE, M. ; Y. DONATH, F. Homo-Delarche and M.: Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. In: *Diabetes* 56 (2007), Nr. 9, S. 2356–2370
- [156] BROWN, J. C. ; DRYBURGH, J. R. ; ROSS, S. A. ; DUPRE, J.: Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide. In: *Recent Prog. Horm. Res.* 31 (1975), S. 487–532
- [157] KREYMANN, B. ; WILLIAMS, G. ; GHATEI, M. A. ; BLOOM, S. R.: Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. In: *Lancet* 2 (1987), Nr. 8571, S. 1300–1304
- [158] MOJSOV, S. ; KOPCZYNSKI, M. G. ; HABENER, J. F.: Both amidated and nonamidated forms of glucagon-like peptide I are synthesized in the rat intestine and the pancreas. In: *J. Biol. Chem.* 265 (1990), Nr. 14, S. 8001–8008
- [159] MOJSOV, S. ; HEINRICH, G. ; WILSON, I. B. ; RAVAZZOLA, M. ; HABENER, L. Orci and J. F.: Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. In: *J. Biol. Chem.* 261 (1986), Nr. 25, S. 11880–11889
- [160] ELLIOTT, R. M. ; MORGAN, L. M. ; TREDGER, J. A. ; DEACON, S. ; MARKS, J. Wright and V.: Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. In: *J. Endocrinol.* 138 (1993), Nr. 1, S. 159–166
- [161] JANG, H. J. ; KOKRASHVILI, Z. ; THEODORAKIS, M. J. ; J. KIM, O. D. C. ; ZHOU, J. ; KIM, H. H. ; XU, X. ; CHAN, S. L. ; BERNIER, M. Juhaszova and M. ; MOSINGER, B. ; MARGOLSKEE, R. F. ; EGAN, J. M.: Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007), Nr. 38, S. 15069–15074

- [162] BEYSEN, C. ; KARPE, F. ; FIELDING, B. A. ; CLARK, A. ; N. FRAYN, J. C. L.: Interaction between specific fatty acids, GLP-1 and insulin secretion in humans. In: *Diabetologia* 45 (2002), Nr. 11, S. 1533–1541
- [163] HIRASAWA, A. ; TSUMAYA, K. ; AWAJI, T. ; KATSUMA, S. ; YAMADA, T. A. ; SUGIMOTO, Y. ; MIYAZAKI, S. ; TSUJIMOTO, G.: Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. In: *Nat. Med.* 11 (2005), Nr. 1, S. 90–94
- [164] BAGGIO, L. L. ; DRUCKER, D. J.: Biology of incretins: GLP-1 and GIP. In: *Gastroenterology* 132 (2007), Nr. 6, S. 2131–2157
- [165] MENTLEIN, R. ; GALLWITZ, B. ; SCHMIDT, W. E.: Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. In: *Eur. J. Biochem.* 214 (1993), Nr. 3, S. 829–835
- [166] DEACON, C. F. ; WAMBERG, S. ; BIE, P. ; HUGHES, T. E. ; HOLST, J. J.: Preservation of active incretin hormones by inhibition of dipeptidyl peptidase IV suppresses meal-induced incretin secretion in dogs. In: *J. Endocrinol.* 172 (2002), Nr. 2, S. 355–362
- [167] ENG, J. ; KLEINMAN, W. A. ; SINGH, L. ; SINGH, G. ; RAUFMAN, J. P.: Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. In: *J. Biol. Chem.* 267 (1992), Nr. 11, S. 7402–7405
- [168] YOUNG, A. A. ; GEDULIN, B. R. ; BHAVSAR, S. ; BODKIN, N. ; HANSEN, C. Jodka and B. ; DENARO, M.: Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese

- diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). In: *Diabetes* 48 (1999), Nr. 5, S. 1026–1034
- [169] XU, G. ; STOFFERS, D. A. ; HABENER, J. F. ; BONNER-WEIR, S.: Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. In: *Diabetes* 48 (1999), Nr. 12, S. 2270–2276
- [170] SZAYNA, M. ; DOYLE, M. E. ; BETKEY, J. A. ; HOLLOWAY, H. W. ; G.SPENCER, R. ; GREIG, N. H. ; EGAN, J. M.: Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. In: *Endocrinology* 141 (2000), Nr. 6, S. 1936–1941
- [171] CHEN, J. ; YU, L. ; WANG, L. ; FANG, X. ; LI, L. ; LI, W.: Stability of synthetic exendin-4 in human plasma in vitro. In: *Protein Pept. Lett.* 14 (2007), Nr. 1, S. 19–25
- [172] RAUFMAN, J. P. ; SINGH, L. ; ENG, J.: Exendin-3, a novel peptide from *Heloderma horridum* venom, interacts with vasoactive intestinal peptide receptors and a newly described receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. Description of exendin-3(9-39)amide, a specific exendin receptor antagonist. In: *J. Biol. Chem.* 266 (1991), Nr. 5, S. 2897–2902
- [173] THORKILDSEN, C. ; NEVE, S. ; LARSEN, B. D. ; MEIER, E. ; PETERSEN, J. S.: Glucagon-like peptide 1 receptor agonist ZP10A increases insulin mRNA expression and prevents diabetic progression in db/db mice. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307 (2003), Nr. 2, S. 490–496
- [174] LARSEN, P. J. ; FLEDELIUS, C. ; KNUDSEN, L. B. ; TANG-CHRISTENSEN, M.: Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and rever-

- sible weight loss in both normal and obese rats. In: *Diabetes* 50 (2001), Nr. 11, S. 2530–2539
- [175] KIM, J. G. ; BAGGIO, L. L. ; BRIDON, D. P. ; CASTAIGNE, J. P. ; F.ROBITAILLE, M. ; JETTE, L. ; BENQUET, C. ; DRUCKER, D. J.: Development and characterization of a glucagon-like peptide 1-albumin conjugate:the ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor in vivo. In: *Diabetes* 52 (2003), Nr. 3, S. 751–759
- [176] BAGGIO, L. L. ; HUANG, Q. ; BROWN, T. J. ; DRUCKER, D. J.: A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (albugon)mimics peptidergic activation of GLP-1 receptor-dependent pathways coupledwith satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis. In: *Diabetes* 53 (2004), Nr. 9, S. 2492–2500
- [177] BAGGIO, L. L. ; HUANG, Q. ; CAO, X. ; DRUCKER, D. J.: An albumin-exendin-4 conjugate engages central and peripheral circuits regulatingmurine energy and glucose homeostasis. In: *Gastroenterology* DOI10.1053/j.gastro.2008.01.017 (2008)
- [178] KAPITZA, C. ; HEISE, T. ; KLEIN, O.: BIM51077, a novel GLP-1 analog, achieves sustained improvement in bloodglucose control over 28 days of treatment. In: *Program and abstracts of the American Diabetes Association 66th ScientificSessions; June 9-13, 2006; Washington, DC. Abstract 500-P* (2008)
- [179] NASLUND, E. ; SKOGAR, S. ; EFENDIC, S. ; HELLSTROM, P. M.: Glucagon-like peptide-1 analogue LY315902: effect on intestinal motilityand release of insulin and somatostatin. In: *Regul. Pept.* 106 (2002), Nr. 1-3, S. 89–95
- [180] THORENS, B.: Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretinhormone glucagon-like peptide

1. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89 (1992), Nr. 18, S. 8641–8645
- [181] PARKER, J. C. ; ANDREWS, K. M. ; RESCEK, D. M. ; W. MASSEFSKI, Jr. and G. C. A. ; CONTILLO, L. G. ; STEVENSON, R. W. ; SULESKE, D. H. Singleton and R. T.: Structure-function analysis of a series of glucagon-like peptide-1 analogs. In: *J. Pept. Res.* 52 (1998), Nr. 5, S. 398–409
- [182] TIBADUIZA, E. C. ; CHEN, C. ; BEINBORN, M.: A small molecule ligand of the glucagon-like peptide 1 receptor targets its amino-terminal hormone binding domain. In: *J. Biol. Chem.* 276 (2001), Nr. 41, S. 37787–37793
- [183] WILMEN, A. ; EYLL, B. V. ; GOKE, B. ; GOKE, R.: Five out of six tryptophan residues in the N-terminal extracellular domain of the rat GLP-1 receptor are essential for its ability to bind GLP-1. In: *Peptides* 18 (1997), Nr. 2, S. 301–305
- [184] XIAO, Q. ; JENG, W. ; WHEELER, M. B.: Characterization of glucagon-like peptide-1 receptor-binding determinants. In: *J. Mol. Endocrinol.* 25 (2000), Nr. 3, S. 321–335
- [185] HALLBRINK, M. ; HOLMQVIST, T. ; OLSSON, M. ; OSTENSON, C. G. ; LANGEL, S. Efendic and U.: Different domains in the third intracellular loop of the GLP-1 receptor are responsible for Galpha(s) and Galpha(i)/Galpha(o) activation. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1546 (2001), Nr. 1, S. 79–86
- [186] CAMPOS, R. V. ; LEE, Y. C. ; DRUCKER, D. J.: Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. In: *Endocrinology* 134 (1994), Nr. 5, S. 2156–2164
- [187] BULLOCK, B. P. ; HELLER, R. S. ; HABENER, J. F.: Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. In: *Endocrinology* 137 (1996), Nr. 7, S. 2968–2978

- [188] DRUCKER, D. J. ; PHILIPPE, J. ; MOJSOV, S. ; CHICK, W. L. ; HABENER, J. F.: Glucagonlike Peptide-I Stimulates Insulin Gene-Expression and Increases Cyclic-Amp Levels in A Rat Islet Cell-Line. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (1987), Nr. 10, S. 3434–3438
- [189] MONTROSE-RAFIZADEH, C. ; AVDONIN, P. ; GARANT, M. J. ; KOLE, B. D. Rodgers and S. ; YANG, H. ; LEVINE, M. A. ; SCHWINDINGER, W. ; BERNIER, M.: Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells. In: *Endocrinology* 140 (1999), Nr. 3, S. 1132–1140
- [190] WHEELER, M. B. ; LU, M. ; DILLON, J. S. ; LENG, X. H. ; E. BOYD, III C. Chen a.: Functional expression of the rat glucagon-like peptide-I receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C. In: *Endocrinology* 133 (1993), Nr. 1, S. 57–62
- [191] HOLZ, G. G. ; LEECH, C. A. ; HELLER, R. S. ; CASTONGUAY, M. ; F. HABENER, J.: cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores by activation of fryanodine receptors in pancreatic beta-cells. A Ca<sup>2+</sup> signaling system stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37). In: *J. Biol. Chem.* 274 (1999), Nr. 20, S. 14147–14156
- [192] TSUBOI, T. ; SILVA DA, X ; HOLZ, G. G. ; JOUAVILLE, L. S. ; RUTTER, A. P. Thomas and G. A.: Glucagon-like peptide-1 mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> and stimulates mitochondrial-ATP synthesis in pancreatic MIN6 beta-cells. In: *Biochem. J.* 369 (2003), Nr. Pt 2, S. 287–299
- [193] MACDONALD, P. E. ; KHOLY, W. E. ; RIEDEL, M. J. ; E. LIGHT, A. M. S. ; WHEELER, M. B.: The multiple actions of GLP-

- 1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. In: *Diabetes* 51 Suppl 3 (2002), S. S434–S442
- [194] ALARCON, C. ; WICKSTEED, B. ; RHODES, C. J.: Exendin 4 controls insulin production in rat islet beta cells predominantly by potentiation of glucose-stimulated proinsulin biosynthesis at the translational level. In: *Diabetologia* (2006)
- [195] FEHMANN, H. C. ; HABENER, J. F.: Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. In: *Endocrinology* 130 (1992), Nr. 1, S. 159–166
- [196] WANG, X. ; CAHILL, C. M. ; PINEYRO, M. A. ; ZHOU, J. ; M. EGAN, M. E. D.: Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. In: *Endocrinology* 140 (1999), Nr. 10, S. 4904–4907
- [197] WANG, X. ; ZHOU, J. ; DOYLE, M. E. ; EGAN, J. M.: Glucagon-like peptide-1 causes pancreatic duodenal homeobox-1 protein translocation from the cytoplasm to the nucleus of pancreatic beta-cells by a cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A-dependent mechanism. In: *Endocrinology* 142 (2001), Nr. 5, S. 1820–1827
- [198] HOLZ, G. G. ; KUHTREIBER, W. M. ; HABENER, J. F.: Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). In: *Nature* 361 (1993), Nr. 6410, S. 362–365
- [199] HUI, H. ; NOURPARVAR, A. ; ZHAO, X. ; PERFETTI, R.: Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. In: *Endocrinology* 144 (2003), Nr. 4, S. 1444–1455



- [200] FARILLA, L. ; HUI, H. ; BERTOLOTTI, C. ; KANG, E. ; BULLOTTA, A. ; MARIO, U. Di ; PERFETTI, R.: Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. In: *Endocrinology* 143 (2002), Nr. 11, S. 4397–4408
- [201] FARILLA, L. ; BULLOTTA, A. ; HIRSHBERG, B. ; LI, Calzi S. ; NOUSHMEHR, N. Khouryand H. ; BERTOLOTTI, C. ; MARIO, U. D. ; PERFETTI, D. M. H.: Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. In: *Endocrinology* 144 (2003), Nr. 12, S. 5149–5158
- [202] MELLADO-GIL, J. M. ; AGUILAR-DIOSDADO, M.: High glucose potentiates cytokine- and streptozotocin-induced apoptosis of rat islet cells: effect on apoptosis-related genes. In: *Journal of Endocrinology* 183 (2004), Nr. 1, S. 155–162
- [203] LI, Y. ; HANSOTIA, T. ; YUSTA, B. ; RIS, F. ; HALBAN, P. A. ; J. DRUCKER, D.: Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. In: *J. Biol. Chem.* 278 (2003), Nr. 1, S. 471–478
- [204] WANG, Q. ; LI, L. ; XU, E. ; WONG, V. ; RHODES, C. ; BRUBAKER, P. L.: Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic INS-1 beta cells. In: *Diabetologia* 47 (2004), Nr. 3, S. 478–487
- [205] BUTEAU, J. ; FOISY, S. ; JOLY, E. ; PRENTKI, M.: Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. In: *Diabetes* 52 (2003), Nr. 1, S. 124–132
- [206] CHO, H. ; THORVALDSEN, J. L. ; CHU, Q. ; FENG, F. ; BIRNBAUM, M. J.: Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. In: *J. Biol. Chem.* 276 (2001), Nr. 42, S. 38349–38352

- [207] CHO, H. ; MU, J. ; KIM, J. K. ; THORVALDSEN, J. L. ; CHU, Q. ; E. B. CRENSHAW, III ; KAESTNER, K. H. ; BARTOLOMEI, M. S. ; BIRNBAUM, G. I. Shulman and M. J.: Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). In: *Science* 292 (2001), Nr. 5522, S. 1728–1731
- [208] GAROFALO, R. S. ; ORENA, S. J. ; RAFIDI, K. ; TORCHIA, A. J. ; L. STOCK, J. ; HILDEBRANDT, A. L. ; COSKRAN, T. ; BLACK, S. C. ; WICKS, D. J. Brees and J. R. ; MCNEISH, J. D. ; COLEMAN, K. G.: Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. In: *J. Clin. Invest* 112 (2003), Nr. 2, S. 197–208
- [209] CARDONE, M. H. ; ROY, N. ; STENNICKE, H. R. ; SALVESEN, G. S. ; F. FRANKE, T. ; STANBRIDGE, E. ; FRISCH, S. ; REED, J. C.: Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. In: *Science* 282 (1998), Nr. 5392, S. 1318–1321
- [210] PESO, L. del ; GONZALEZ-GARCIA, M. ; PAGE, C. ; HERRERA, R. ; NUNEZ, G.: Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. In: *Science* 278 (1997), Nr. 5338, S. 687–689
- [211] RANTA, F. ; AVRAM, D. ; BERCHTOLD, S. ; DUFER, M. ; DREWS, G. ; F. LANG ; ULLRICH, S.: Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4. In: *Diabetes* 55 (2006), Nr. 5, S. 1380–1390
- [212] LIZCANO, J. M. ; MORRICE, N. ; COHEN, P.: Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. In: *Biochem. J.* 349 (2000), Nr. Pt 2, S. 547–557
- [213] VIRDEE, K. ; PARONE, P. A. ; TOLKOVSKY, A. M.: Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BAD on serine 155, a novel-

- site, contributes to cell survival. In: *Curr. Biol.* 10 (2000), Nr. 18, S. 1151–1154
- [214] YUSTA, B. ; BAGGIO, L. L. ; ESTALL, J. L. ; KOEHLER, J. A. ; LI, D. P. Hollandand H. ; PIPELEERS, D. ; LING, Z. ; DRUCKER, D. J.: GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. In: *Cell Metab* 4 (2006), Nr. 5, S. 391–406
- [215] ASFARI, M. ; JANJIC, D. ; MEDA, P. ; LI, G. D. ; HALBAN, P. A. ; WOLLHEIM, C.B.: Establishment of 2-Mercaptoethanol-Dependent Differentiated Insulin-Secreting Cell-Lines. In: *Endocrinology* 130 (1992), Nr. 1, S. 167–178
- [216] FISKE, C. H. ; SUBBAROW, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. In: *J. Biol. Chem.* 66 (1925), Nr. 2, S. 375
- [217] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal. Biochem.* 72 (1976), S. 248–254
- [218] RABILLOUD, T. ; STRUB, J. M. ; LUCHE, S. ; DORSSELAER, A. V. ; LUNARDI, J.: A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. In: *Proteomics.* 1 (2001), Nr. 5, S. 699–704
- [219] LEHR, S. ; KOTZKA, J. ; AVCI, H. ; KNEBEL, B. ; MULLER, S. ; G.HANISCH, F. ; JACOB, S. ; HAAK, C. ; SUSANTO, F. ; MULLER-WIELAND, D.: Effect of sterol regulatory element binding protein-1a on the mitochondrial protein pattern in human liver cells detected by 2D-DIGE. In: *Biochemistry* 44 (2005), Nr. 13, S. 5117–5128
- [220] RAKATZI, I. ; SEIPKE, G. ; ECKEL, J.: [LysB3, GluB29] insulin: a novel insulin analog with enhanced beta-cell protective

- action. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 (2003), Nr. 3, S. 852–859
- [221] MAEDLER, K. ; SCHULTHESS, F. T. ; BIELMAN, C. ; BERNEY, T. ; PRENTKI, C. Bonnyand M. ; DONATH, M. Y. ; RODUIT, R.: Glucose and leptin induce apoptosis in human beta-cells and impair glucose-stimulated insulin secretion through activation of c-Jun N-terminal kinases. In: *FASEB J.* (2008)
- [222] D'HERTOG, W. ; OVERBERGH, L. ; LAGE, K. ; FERREIRA, G. B. ; GYSEMANS, M. Marisand C. ; FLAMEZ, D. ; CARDOZO, A. K. ; SCHOofs, Bergh G. V. a. ; ARCKENS, L. ; MOREAU, Y. ; HANSEN, D. A. ; WAELKENS, D. L. Eizirikand E. ; MATHIEU, C.: Proteomic analysis of cytokine-induced dysfunction and death in insulin-producing INS-1E cells: New insights into the pathways involved. In: *Mol. Cell Proteomics.* (2007)
- [223] FERNANDEZ, C. ; FRANSSON, U. ; HALLGARD, E. ; SPEGEL, P. ; KROGH, C. H. ; WARELL, K. ; JAMES, P. ; MULDER, H.: Metabolomic and proteomic analysis of a clonal insulin-producing beta-cell line (INS-1 832/13). In: *J. Proteome. Res.* 7 (2008), Nr. 1, S. 400–411
- [224] CHICK, W. L. ; WARREN, S. ; CHUTE, R. N. ; LIKE, A. A. ; C. KITCHEN, V. L.: A transplantable insulinoma in the rat. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74 (1977), Nr. 2, S. 628–632
- [225] WOBSEr, H. ; DUSSMANN, H. ; KOGEL, D. ; WANG, H. Y. ; B. WOLLHEIM, C. R. ; BYRNE, M. M. ; PREHN, J. H. M.: Dominant-negative suppression of HNF-1 alpha results in mitochondrial dysfunction, INS-1 cell apoptosis, and increased sensitivity to ceramide-, but not to high glucose-induced cell death. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), Nr. 8, S. 6413–6421

- [226] ZAWALICH, W. S. ; ZAWALICH, K. C.: Regulation of insulin secretion by phospholipase C. In: *Am. J. Physiol* 271 (1996), Nr. 3 Pt 1, S. E409–E416
- [227] CHEN, J. ; COUTO, F. M. ; MINN, A. H. ; SHALEV, A.: Exenatide inhibits beta-cell apoptosis by decreasing thioredoxin-interacting protein. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346 (2006), Nr. 3, S. 1067–1074
- [228] MINN, A. H. ; HAFELE, C. ; SHALEV, A.: Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta cell apoptosis. In: *Endocrinology* (2005)
- [229] SPECTOR, A. A.: Structure and lipid binding properties of serum albumin. In: *Methods Enzymol.* 128 (1986), S. 320–339
- [230] RAKATZI, I. ; MUELLER, H. ; RITZELER, O. ; TENNAGELS, N. ; ECKEL, J.: Adiponectin counteracts cytokine- and fatty acid-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1. In: *Diabetologia* 47 (2004), Nr. 2, S. 249–258
- [231] LAI, E. ; BIKOPOULOS, G. ; WHEELER, M. ; ROZAKIS-ADCOCK, M. ; VOLCHUK, A.: Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells. In: *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* (2008)
- [232] ORSKOV, C. ; RABENHOJ, L. ; WETTERGREN, A. ; KOFOD, H. ; HOLST, J. J.: Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. In: *Diabetes* 43 (1994), Apr, S. 535–539
- [233] CALARA, Federico ; TAYLOR, Kristin ; HAN, Jenny ; ZABALA, Evelyn ; CARR, Eh M. ; WINTLE, Matthew ; FINEMAN, Mark:

- A randomized, open-label, crossover study examining the effect of injection site on bioavailability of exenatide (synthetic exendin-4). In: *Clin Ther* 27 (2005), Feb, Nr. 2, S. 210–215
- [234] KUTLU, B. ; CARDOZO, A. K. ; DARVILLE, M. I. ; KRUIHOFFER, M. ; ORNTOFT, N. Magnusson and T. ; EIZIRIK, D. L.: Discovery of gene networks regulating cytokine-induced dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells. In: *Diabetes* 52 (2003), Nr. 11, S. 2701–2719
- [235] HUI, H. ; FARILLA, L. ; MERKEL, P. ; PERFETTI, R.: The short half-life of glucagon-like peptide-1 in plasma does not reflect its long-lasting beneficial effects. In: *Eur. J. Endocrinol.* 146 (2002), Nr. 6, S. 863–869
- [236] ISCHIROPOULOS, H. ; BECKMAN, J. S.: Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? In: *J. Clin. Invest* 111 (2003), Nr. 2, S. 163–169
- [237] LENAZ, G.: The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. In: *IUBMB. Life* 52 (2001), Nr. 3-5, S. 159–164
- [238] FRIDOVICH, I.: Superoxide radical and superoxide dismutases. In: *Annu. Rev. Biochem.* 64 (1995), S. 97–112
- [239] KOHNKE, R. ; MEI, J. ; PARK, M. ; YORK, D. A. ; ERLANSON-ALBERTSSON, C.: Fatty acids and glucose in high concentration down-regulates ATP synthase beta-subunit protein expression in INS-1 cells. In: *Nutr. Neurosci.* 10 (2007), Nr. 5-6, S. 273–278
- [240] SALEH, M. C. ; FATEHI-HASSANABAD, Z. ; WANG, R. ; NINO-FONG, R. ; WADOWSKA, D.W. ; WRIGHT, G. M. ; HARPER, M. E. ; CHAN, C. B.: Mutated ATP synthase induces oxidative stress and impaired insulin secretion in beta-cells of female BHE/cdb rats. In: *Diabetes Metab Res. Rev.* (2008)

- [241] WELSH, N. ; EIZIRIK, D. L. ; BENDTZEN, K. ; SANDLER, S.: Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in isolated rat pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Krebs cycle enzyme aconitase. In: *Endocrinology* 129 (1991), Nr. 6, S. 3167–3173
- [242] LIOCHEV, S. I. ; FRIDOVICH, I.: The relative importance of HO\* and ONOO- in mediating the toxicity of O2.-. In: *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999), Nr. 5-6, S. 777–778
- [243] VASQUEZ-VIVAR, J. ; KALYANARAMAN, B. ; KENNEDY, M. C.: Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation. In: *J. Biol. Chem.* 275 (2000), Nr. 19, S. 14064–14069
- [244] TUOMINEN, E. K. ; WALLACE, C. J. ; KINNUNEN, P. K.: Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. In: *J. Biol. Chem.* 277 (2002), Nr. 11, S. 8822–8826
- [245] SHIDOJI, Y. ; HAYASHI, K. ; KOMURA, S. ; OHISHI, N. ; YAGI, K.: Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264 (1999), Nr. 2, S. 343–347
- [246] PARADIES, G. ; PETROSILLO, G. ; PISTOLESE, M. ; RUGGIERO, F. M.: The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. In: *FEBS Lett.* 466 (2000), Nr. 2-3, S. 323–326
- [247] OTT, M. ; ZHIVOTOVSKY, B. ; ORRENIUS, S.: Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. In: *Cell Death. Differ.* 14 (2007), Nr. 7, S. 1243–1247
- [248] CNOP, M. ; WELSH, N. ; JONAS, J. C. ; JORNS, A. ; LENZEN, S. ; L. EIZIRIK, D.: Mechanisms of pancreatic beta-cell death in

- type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. In: *Diabetes* 54 Suppl 2 (2005), S. S97–107
- [249] FREIDEN, P. J. ; GAUT, J. R. ; HENDERSHOT, L. M.: Interconversion of three differentially modified and assembled forms of BiP. In: *EMBO J.* 11 (1992), Nr. 1, S. 63–70
- [250] BRUBAKER, P. L. ; DRUCKER, D. J.: Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. In: *Endocrinology* 145 (2004), Nr. 6, S. 2653–2659
- [251] BUTEAU, J. ; RODUIT, R. ; SUSINI, S. ; PRENTKI, M.: Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. In: *Diabetologia* 42 (1999), Nr. 7, S. 856–864
- [252] BUTEAU, J. ; FOISY, S. ; RHODES, C. J. ; CARPENTER, L. ; PRENTKI, T. J. Bidenand M.: Protein kinase C $\zeta$  activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation. In: *Diabetes* 50 (2001), Nr. 10, S. 2237–2243
- [253] JHALA, U. S. ; CANETTIERI, G. ; SCREATON, R. A. ; KRAJEWSKI, R. N. K. ; REED, J. ; WALKER, J. ; LIN, X. ; WHITE, M. ; MONTMINY, M.: cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. In: *Genes Dev.* 17 (2003), Nr. 13, S. 1575–1580
- [254] PARK, S. ; DONG, X. ; FISHER, T. L. ; DUNN, S. ; OMER, A. K. ; WHITE, G. Weirand M. F.: Exendin-4 uses Irs2 signaling to mediate pancreatic beta cell growth and function. In: *J. Biol. Chem.* 281 (2006), Nr. 2, S. 1159–1168
- [255] TRUMPER, K. ; TRUMPER, A. ; TRUSHEIM, H. ; ARNOLD, R. ; HORSCH, B. G.: Integrative mitogenic role of protein kinase



- B/Akt in beta-cells. In: *Vip, Pacap, Glucagon, and Related Peptides* 921 (2000), S. 242–250
- [256] KWON, G. ; PAPPAN, K. L. ; MARSHALL, C. A. ; SCHAFER, J. E. ; L.MCDANIEL, M.: cAMP Dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both proteinkinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in beta-cells. In: *J. Biol. Chem.* 279 (2004), Nr. 10, S. 8938–8945
- [257] DATTA, S. R. ; BRUNET, A. ; GREENBERG, M. E.: Cellular survival: a play in three Akts. In: *Genes Dev.* 13 (1999), Nr. 22, S. 2905–2927
- [258] HOLST, L. S. ; MULDER, H. ; MANGANIELLO, V. ; SUNDLER, F. ; HOLM, B. Ahrenand C. ; DEGERMAN, E.: Protein kinase B is expressed in pancreatic beta cells and activated upon stimulation with insulin-like growth factor I. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250 (1998), Nr. 1, S. 181–186
- [259] LINGOHR, M. K. ; DICKSON, L. M. ; MCCUAIG, J. F. ; HUGL, S. R. ; TWARDZIK, D.R. ; RHODES, C. J.: Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF-alpha or EGF, augments pancreatic beta-cell proliferation. In: *Diabetes* 51 (2002), Nr. 4, S. 966–976
- [260] LEBRAS, S. ; CZERNICHOW, P. ; SCHARFMANN, R.: A search for tyrosine kinase receptors expressed in the rat embryonic pancreas. In: *Diabetologia* 41 (1998), Nr. 12, S. 1474–1481
- [261] KURTZHALS, P. ; SCHAFFER, L. ; SORENSEN, A. ; KRISTENSEN, C. ; SCHMID, I. Jonassenand C. ; TRUB, T.: Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. In: *Diabetes* 49 (2000), Nr. 6, S. 999–1005
- [262] BURKS, D. J. ; WHITE, M. F.: IRS proteins and beta-cell function. In: *Diabetes* 50 Suppl 1 (2001), S. S140–S145

- [263] LINGOHR, M. K. ; DICKSON, L. M. ; WREDE, C. E. ; BRIAUD, I. ; F.MCCUAIG, J. ; M. G. MYERS, Jr. ; RHODES, C. J.: Decreasing IRS-2 expression in pancreatic beta-cells (INS-1) promotes apoptosis, which can be compensated for by introduction of IRS-4 expression. In: *Mol. Cell Endocrinol.* 209 (2003), Nr. 1-2, S. 17–31
- [264] WITHERS, D. J. ; GUTIERREZ, J. S. ; TOWERY, H. ; BURKS, D. J. ; M.REN, J. ; PREVIS, S. ; ZHANG, Y. ; BERNAL, D. ; PONS, S. ; BONNER-WEIR, G. I. Shulman and S. ; WHITE, M. F.: Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. In: *Nature* 391 (1998), Nr. 6670, S. 900–904
- [265] CIARALDI, T. P. ; CARTER, L. ; SEIPKE, G. ; MUDALIAR, S. ; HENRY, R. R.: Effects of the long-acting insulin analog insulin glargine on cultured human skeletal muscle cells: comparisons to insulin and IGF-I. In: *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001), Dec, Nr. 12, S. 5838–5847
- [266] STAIGER, K. ; STAIGER, H. ; SCHWEITZER, M. A. ; METZINGER, E. ; BALLETSCHOFER, B. ; HARING, H-U. ; KELLERER, M.: Insulin and its analogue glargine do not affect viability and proliferation of human coronary artery endothelial and smooth muscle cells. In: *Diabetologia* 48 (2005), Sep, Nr. 9, S. 1898–1905
- [267] ECKARDT, K. ; MAY, C. ; KOENEN, M. ; ECKEL, J.: IGF-1 receptor signalling determines the mitogenic potency of insulin analogues in human smooth muscle cells and fibroblasts. In: *Diabetologia* 50 (2007), Dec, Nr. 12, S. 2534–2543
- [268] KOEHLER, Jacqueline A. ; DRUCKER, Daniel J.: Activation of glucagon-like peptide-1 receptor signaling does not modify the growth or apoptosis of human pancreatic cancer cells. In: *Diabetes* 55 (2006), May, Nr. 5, S. 1369–1379

# 7 ANHANG

## 7.1 Abkürzungen

AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Akt	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	alkalische Phosphatase
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cyt c	Cytochrom c
DCF	5-(und 6-)chloromethyl-2'7'-dichlorhydrofluorescein-diacetat
DD	Todesdomäne
DED	Todeseffektordomäne
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
Epac2	exchange factor directly activated by cAMP 2
Ex-4	Exendin-4
FCS	fötales Kälberserum
GIP	<i>glucose-dependent insulintropic peptide</i>
Glp-1	<i>glucagon like peptide 1</i>
Glp-1RA	Glp-1 Rezeptor Agonisten
HDL	Hochdichte-Lipoprotein
IAP	Inhibitor der Apoptose Protein
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
IL-1	Interleukin-1
IFN	Interferon
INT	p-Jodnitrotetrazoliumviolett
MPT	<i>mitochondrial permeability transition</i>

NAIP	<i>neuronal apoptosis inhibiting protein</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Posphat-gepufferte Salzlösung
Pdx-1	<i>pancreatic duodenum homeobox-1</i>
PI	Propidiumjodid
PTM	Post-translational(e) Modifikation(en)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	saure Phosphatase
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Bcl-2-Proteinfamilie . .	11
1.2	Die extrinsische Signalkaskade durch CD95 und TNFR1	13
1.3	Der intrinsische Signalweg der Apoptose . . . . .	17
1.4	Signaltransduktion der Zytokin-induzierten Apoptose	23
1.5	Schematische Struktur von Proglucagon und seine Pro- zessierung in Pankreas und Intestinaltrakt . . . . .	25
2.1	Differentielle Zentrifugation zur Anreicherung funk- tioneller Mitochondrien . . . . .	42
2.2	Schematische Darstellung eines Western Blot nach dem Semi-Dry-Verfahren . . . . .	51
3.1	Insulinsekretion . . . . .	57
3.2	Inhibition von Zytokin-induzierter Apoptose durch Glp- 1RA . . . . .	58
3.3	Inhibition von Glukose-induzierter Apoptose durch Glp- 1RA . . . . .	59
3.4	Inhibition von FFA-induzierter Apoptose durch Glp-1RA	61
3.5	Anreicherung von Organellen während der subzellu- lären Fraktionierung . . . . .	62
3.6	Mitochondriales Proteinmuster aus INS-1 Zellen . . .	64
3.7	Regulation von Proteinen der Atmungskette . . . . .	70
3.8	Regulation der Grp78/BiP-Expression . . . . .	71
3.9	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Zytokin- und Glukosebehandlung . . . . .	73
3.10	Messung von cAMP Spiegeln nach Glp-1RA-Stimulus	74
3.11	Kurzzeitige Aktivierung der Akt durch Glp-1 Rezepto- ragonisten . . . . .	76
3.12	Langzeitige Aktivierung der Akt durch Glp-1 Rezepto- ragonisten . . . . .	77
3.13	Transiente Genrepression der Akt . . . . .	78

3.14 Auswirkungen des Akt Silencing aus die Glp-1 rezeptorvermittelte anti-apoptotische Wirkung . . . . .	80
3.15 Auswirkungen von Glp-1 Rezeptoragonisten und Insulinanaloga auf die zytokininduzierte Apoptose . . .	82
3.16 Auswirkungen von Glp-1 Rezeptoragonisten und Insulinanaloga auf die fettsäureinduzierte Apoptose . .	83
4.1 Regulation von Proteinen der Atmungskette durch Zytokine und Exendin-4 . . . . .	92

## 7.3 Tabellenverzeichnis

1.1 Caspasen . . . . .	9
2.1 Zusammensetzung der SDS-Gele . . . . .	50
2.2 Phasen der isoelektrischen Fokussierung . . . . .	53
3.1 Identifikation von Proteinen mit veränderter Expression durch Zytokin- und Exendin-4-Behandlung . . .	69
4.1 Zelltypen des endokrinen Pankreas . . . . .	84

## 8 DANKE!

Dass ich diese Arbeit schreiben konnte, verdanke ich in wesentlichen Teilen Prof. Eckel, der mir das Thema Diabetes und Betazell-Untergang näher gebracht hat. Für die hilfreichen Diskussionen, die immer „offene Tür“ und die Möglichkeit, meine Daten in Papierform und auf Kongressen zu präsentieren, möchte ich mich herzlich bedanken.

Prof. Wunderlich danke ich für für die spontane und unkomplizierte Übernahme des Koreferats.

Meinen Familien in Hagen danke ich für den ständigen Rückhalt während meiner Promotion. Ohne Eure finanzielle und seelische Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Chris, Ette, Mette, eM und die Mähs von Q-art. Danke für Eure Freundschaft und für die vielen gemeinsamen Stunden.

Allen Mitarbeitern des DDZ möchte ich für die vergangene Zeit danken, ganz besonders meinen Mit-Doktoranden aus dem Hamsterkäfig und der „2ten“: Robert, der mit mir die letzte Bastion der männlichen Doktoranden aufrecht erhielt, Henrike, Kristin, Annika, Janine, Dani, Raphi und Suse. Stefan, Sonja, Antonia und Waltraud danke ich für die gute Zusammenarbeit im „Mitoprojekt“. Birgit Hurow sei für die Zeit in ihrem „Zweitbüro“ und für die vielen netten Gespräche gedankt. Allen, die ich hier nicht erwähnt habe, sei an dieser Stelle ein Bier für meine Vergesslichkeit versprochen.

Mein letzter und größter Dank gilt Julia, für den ständigen Rückhalt, für Dein Lachen und Deine ganz besondere Art.  
Jag älskar dig!



gesetzt in L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X