

1. Einleitung

Das tägliche Leben eines Menschen ist den ständigen Schwankungen zwischen den Phasen der Nahrungsaufnahme und des Hungerns unterworfen. Trotzdem wird die Konzentration an Glukose im Plasma in einem sehr engen Fenster aufrechterhalten, als ein Akt der Balance zwischen dem einzigen hypoglykämischen Hormon Insulin und den hyperglykämischen Hormonen Glucagon, Katecholaminen, Corticosteroiden und Somatotropin. Die Insulinsekretion durch die β -Zellen des Pankreas wird durch die im Blut zirkulierende Nährstoffe wie Glukose, aber auch freie Fettsäuren und Aminosäuren gesteigert, zusätzlich findet die Modulation der Insulinausschüttung durch die unterschiedlichsten Hormone und Neurotransmitter wie Acetylcholin, GLP-1, Glucagon und viele andere statt (Ahren, 2000; Deeney et al., 2000; Gilon and Henquin, 2001).

Die Störung dieser Regulation kann zur Entstehung der metabolischen Krankheit Diabetes mellitus Typ 2 führen, definiert durch den relativen Insulinmangel im Körper. Zusätzlich kommt es zum deutlichen Anstieg der Insulinresistenz im Fett- und Muskelgewebe. Schon heute sind mehr als 150 Millionen Menschen weltweit an Diabetes erkrankt, und es wird angenommen, dass im Jahr 2010 mehr als 220 Millionen erkranken werden (Skyler, 2004; Zimmet et al., 2001). Auch die Kosten für die Behandlung von Diabetes und dessen Spätfolgen nehmen vom Jahr zum Jahr zu, so betragen die Therapiekosten eines Diabetikers in Deutschland zuletzt knapp 6000€/Jahr (Verspohl, 2002).

Der Verlauf der Erkrankung ist unter anderem durch die kontinuierliche Verschlechterung der Funktion der β -Zelle mit Beeinträchtigung des physiologischen Insulin-Sekretionsmusters gekennzeichnet (Boitard, 2002; Skyler, 2004). Trotz jahrzehntelanger Erforschung der β -Zelle sind zahlreiche Merkmale der komplexen β -Zellregulation und Signaltransduktion unklar.

1.1 Insulinsynthese als Vorstufe der gesteuerten Insulinsekretion

Das endokrine Pankreas besteht aus einzelnen kleinen, im exokrinen Parenchym verteilten Organisationseinheiten, welche als pankreatische

Inseln oder Langerhanssche Inseln bezeichnet werden. Die Inseln beinhalten hunderte bis tausende einzelner Zellen. Bei ca. 70% der Inselzellen handelt es sich um die insulinsezernierenden β -Zellen. Die β -Zellen sind vor allem im Zentrum der Insel lokalisiert und werden von einer ganzen Reihe von anderen Zellen umgeben, wie zum Beispiel von den Glucagon-sezernierenden α -Zellen, Somatostatin-sezernierenden δ -Zellen und den Polypeptid-P-sezernierenden PP-Zellen (Wieczorek et al., 1998). Die β -Zellen sind die einzigen Zellen im Organismus, die unter physiologischen Bedingungen zur Insulinsynthese fähig sind.

Bei der Insulinsynthese in den β -Zellen handelt es sich um einen aus mehreren einzelnen Schritten bestehenden Vorgang, welcher von Hormonen und Botenstoffen kontrolliert wird (Fehmann and Habener, 1992; Nie et al., 2000).

Nach der erfolgten Gentranskription und der Translation der entstandenen mRNA in das Präproinsulin wird das entstandene Molekül zum rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) transloziert und das Signalprotein abgespalten, wodurch das Proinsulin-Molekül entsteht. Das Proinsulin wird vom rER zur *cis*-Seite des Golgi-Apparats transferiert, und in den speziellen *clathrin-coated* Granula von der *trans*-Seite des Golgi-Apparats abgegeben. Die weitere Reifung der Granula beinhaltet die Abspaltung des C-Peptids vom Proinsulin-Molekül durch die Prohormon-Convertasen PC1 und PC2 und die Carboxypeptidase-H. Hierbei entstehen die Insulinkristalle, die in den reifen Granula in den β -Zellen gespeichert werden, bis die Sekretionssignale deren Fusion mit der Zellmembran und die Exozytose verursachen. Unter normalen Bedingungen werden nur wenige Prozent des gespeicherten Insulins nach jeder Mahlzeit freigegeben, so dass die schnelle Auffüllung der Speicher und ein ständig hoher Insulingehalt der β -Zellen sichergestellt ist (Efrat, 2004).

Unter den intrazellulären Faktoren, die an der Insulinsynthese und Insulinfreisetzung der β -Zelle beteiligt sind, wird vor allem einem Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ aus intra- und extrazellulären Quellen eine Schlüsselrolle zugeschrieben (Henquin et al., 2003; Sher et al., 2003). Auch bei diabetisch veränderten β -Zellen kommt es zur Störung des intrazellulären Ca^{2+} -

Haushaltes und des Ca^{2+} -Signalweges (Levy, 1999; Ravier et al., 2002; Yasuda et al., 2002).

1.2 Ca^{2+} als intrazellulärer Botenstoff („second messenger“) in der β -Zelle

Die Mehrheit der Zellen in unserem Organismus verwendet Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum und die Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern für die Signalübertragung innerhalb der Zelle.

Die unterschiedlichen extra- und intrazellulären Stimuli führen zur Aktivierung bestimmter Signalwege, welche zum $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg führen (ON-Mechanismus). Während im Ruhezustand die Konzentration von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ca. 100nM beträgt, führt der Anstieg des Calciums auf Werte zwischen 200 und 1000 nM (**Abb. 1.1**) zur Einleitung von unterschiedlichen intrazellulären

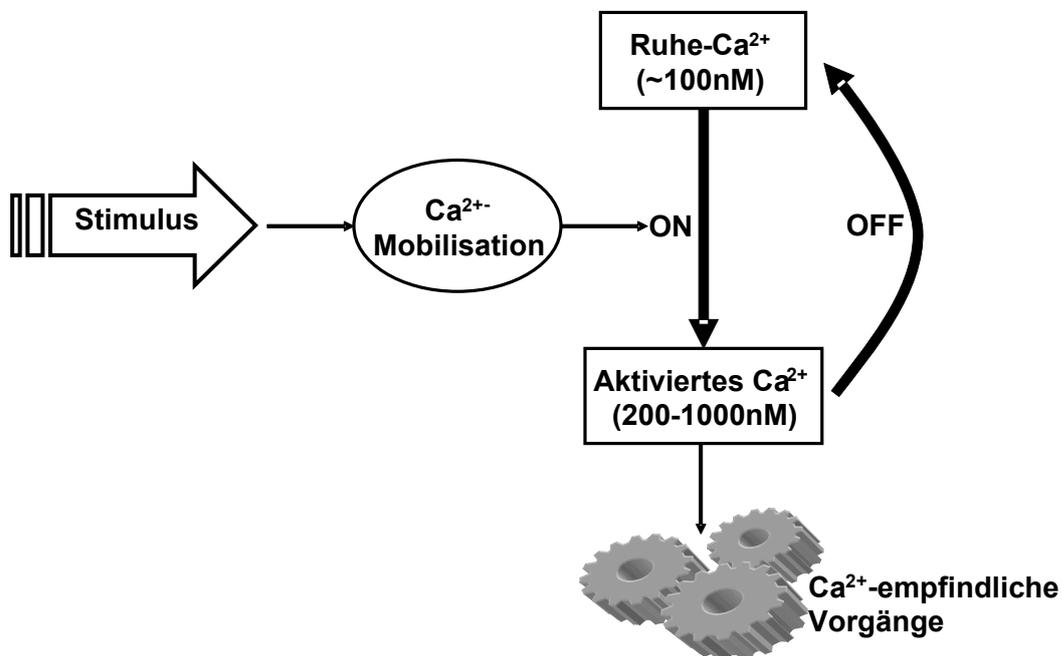


Abb. 1.1 Die extra- und intrazellulären Stimuli wirken über die Ca^{2+} -mobilisierende Signale, die über ON-Mechanismen zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen und die zahlreichen intrazellulären Vorgänge in der Zelle aktivieren. Über die OFF-Mechanismen wird die Ca^{2+} -Konzentration auf das Ausgangsniveau gesenkt.

Vorgängen wie Hormonsekretion, Zellwachstum und Apoptose (Berridge et al., 2000). Über spezialisierte zelluläre Pumpen und Ionenaustauscher erfolgt die Entfernung der Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol und die Rückkehr zum Ruhezustand (OFF-Mechanismus).

In den β -Zellen des Pankreas führt die Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zur Aktivierung intrazellulärer Prozesse, unter anderem kommt es zum Anstieg der Insulinsekretion. Auf der anderen Seite führt die Inhibition der Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration zur Verminderung der Insulinsekretion. Diese Beobachtung und eine ganze Reihe von experimentellen Untersuchungen führte zur Vorstellung, dass es sich bei der Insulinsekretion aus der β -Zelle um einen Ca^{2+} -abhängigen Vorgang handelt (Henquin et al., 2003; Prentki and Matschinsky, 1987; Wollheim and Pralong, 1990).

1.3 Insulinsekretion durch die β -Zellen

Die Insulinfreisetzung findet unter physiologischen Bedingungen nur in Anwesenheit von Glukose statt. Die Stimulation der β -Zelle mit Glukose führt unter physiologischen Bedingungen zur Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und daraufhin zur Insulinfreisetzung. Gleichzeitig besitzt die β -Zelle zahlreiche Möglichkeiten, die glukosebedingte Insulinsekretion den Anforderungen im Organismus anzupassen. Insbesondere die Regulation durch die unterschiedlichen Hormone und Neurotransmitter ermöglicht die exakte Steuerung der freigesetzten Insulindosis und das Erreichen der Normoglykämie. Die intrazellulären Signalwege in der β -Zelle sowohl nach Stimulation mit Glukose (I) als auch nach Hormonstimulation (II-III) werden in **Abb. 1.2** dargestellt.

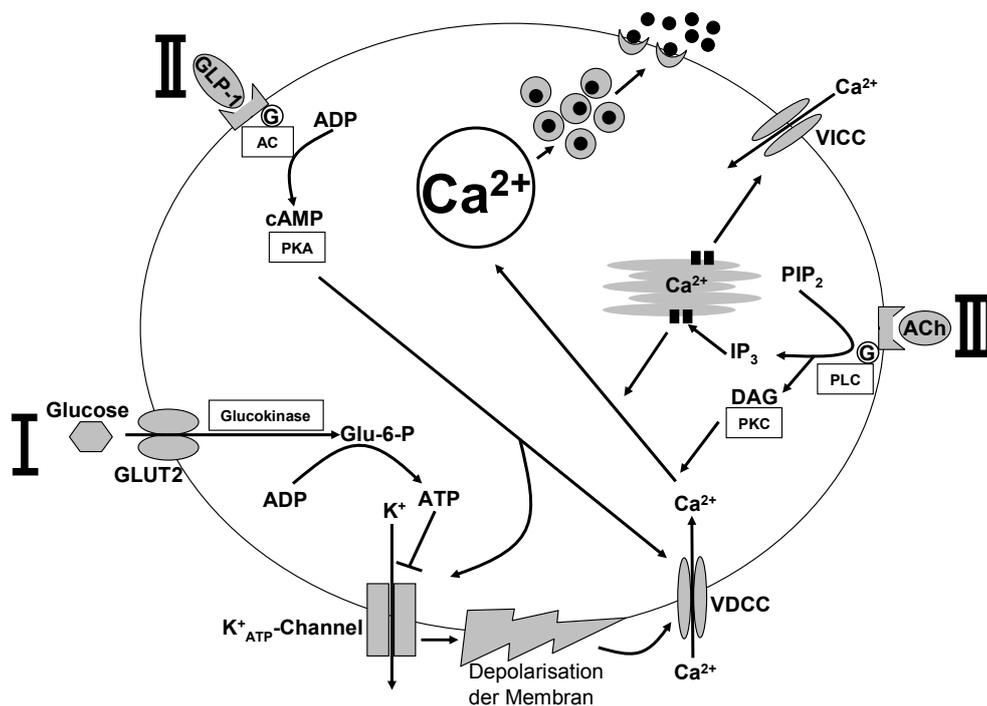


Abb. 1.2 Die β -Zelle zeigt ein komplexes System zur Modulation des Ca^{2+} -Signals und zum Erreichen der adäquaten Insulinsekretion in Abhängigkeit vom aktuellen Bedarf. Hierbei werden mindestens drei Signalwege unterschieden, die einander sowohl stimulieren wie auch inhibieren können.

(I): Glukosevermittelter Signalweg; (II): Inkretin-vermittelter Signalweg; (III): Acetylcholin-vermittelter Signalweg. Weitere Details in Kapiteln 1.3.1 bis 1.3.3.

1.3.1 Glukosevermittelter Ca^{2+} -Anstieg und Insulinsekretion

Die **Abb. 1.2 (I)** stellt den glukoseinduzierten Anstieg des Calciums und die darauf folgende Insulinfreisetzung dar. Die β -Zellen exprimieren den Glukose-Transporter GLUT2, welcher erst den Glukose-Einstrom erlaubt. Die intrazellulär aufgenommene Glukose wird von Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt. Dieser Schritt ist die Schrittmacher-Reaktion bei der Anpassung zwischen der extrazellulären Glukosekonzentration und der Insulinfreisetzung durch die β -Zelle (Grupe et al., 1995; Matschinsky, 2002). Die erhöhten Glukose-6-Phosphat-Konzentrationen führen zum Anstieg des ATP/ADP-Quotienten, was wiederum zur Inhibierung der ATP-empfindlichen K^+ -Kanäle führt. Die K^+ -ATP-Kanäle bestehen aus zwei Tetrameren zweier Proteine: die Funktionsuntereinheit Kir 6.2 und die Regulationsuntereinheit

SUR-1. Die Bindung des intrazellulären ATP an das Kir 6.2 Protein führt zur Schließung des Kanals, während die Bindung des ADP an den SUR1-Rezeptor zur Kanalöffnung führt, was auf die Bedeutung des ATP/ADP-Quotienten hinweist (Aguilar-Bryan and Bryan, 1999; Seino, 1999). Zusätzlich zur Glukose können auch andere Nährstoffe wie zum Beispiel Aminosäuren über die intrazelluläre Verstoffwechslung zur Erhöhung des intrazellulären ATP/ADP-Quotienten und der darauf folgenden Schließung der K^+ _{ATP}-Kanälen führen (Knudsen et al., 1983; Liu et al., 2003).

Die Depolarisation der Zellmembran aufgrund der Schließung der K^+ _{ATP}-Kanäle führt zum Einstrom der Ca^{2+} -Ionen aus dem extrazellulären Raum. Die Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt zur Fusion der insulinhaltigen Vesikeln mit der Zellmembran und zur Insulinfreisetzung in die Blutbahn.

Zusätzlich zum Glukosebedingten Ca^{2+} -Anstieg und der darauf folgenden Insulinfreisetzung gibt es weitere, hormonabhängige Mechanismen, die über verschiedene Signalwege modulierend in die Insulinsekretion eingreifen. Hierbei sind vor allem zwei wichtige, rezeptorabhängige Signalwege zu erwähnen: AC/cAMP- und PLC/IP₃-Signaltransduktionssysteme, die in beiden weiteren Kapiteln ausführlich dargestellt werden.

1.3.2 Inkretin-vermittelter Ca^{2+} -Anstieg und Insulinsekretion

In **Abb. 1.2 (II)** wird die Aktivierung des Ca^{2+} -Signals und Insulinfreisetzung nach Stimulation der β -Zelle mit den gastrointestinalen Hormonen (Inkretinen) dargestellt, die rezeptorvermittelt über die Aktivierung des Enzyms Adenylatcyclase (AC) abläuft.

Nach einer Nährstoffaufnahme werden im gastrointestinalen Trakt die so genannten Inkretine freigesetzt, vor allem GIP und GLP-1, die direkt insulinotrop auf die β -Zelle wirken. Die Bindung der Hormone an spezifische Rezeptoren führt über die Konformationsänderung des Rezeptors (Moens et al., 1996) zur Aktivierung der so genannten GTP-bindenden Proteine (G-Proteine). Es kommt zur Abspaltung der α -Untereinheit des G-Proteins, an die GTP unter Freisetzung von GDP gebunden wird. Die aktivierte α -Untereinheit aktiviert ihrerseits das membranständige Enzym AC, welches

das ATP zum zyklischen cAMP umwandelt. Eine Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel führt zur Aktivierung der Protein Kinase A (PKA) und des vor kurzem nachgewiesenen Enzyms cAMP-GEFII, die ihrerseits über die Phosphorylierung zahlreicher Proteine die zellulären Funktionen verändern. Dabei kommt es zum *cross-talk* zwischen den Glukose- und cAMP-Signatransduktionssystemen, wodurch die Insulinsekretion nur in einer hyperglykämischen Umgebung durch die Inkretine gesteigert werden kann (Byrne et al., 1998; Holz et al., 1993).

PKA und cAMP-GEFII führen zur Schließung der K^+ _{ATP}-Kanäle und zur Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (VDCC), es kommt zum Einstrom des Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum. Es wird angenommen, dass zusätzlich die Freisetzung der intrazellulär gespeicherten Ca^{2+} -Ionen über die PKA/cAMP-GEFII-abhängigen Mechanismen stattfindet (Gromada et al., 1998; Holst and Gromada, 2004; Holz, 2004; Wheeler et al., 1995).

Zusätzlich beeinflussen die Inkretine die Insulinsynthese über die Aktivierung von Promotern wie die β -zellspezifischen Transkriptionsfaktoren IDX-1 und RIP1 über PKA-abhängige und unabhängige Mechanismen (Hansotia and Drucker, 2005; Kemp and Habener, 2001; Skoglund et al., 2000).

1.3.3 ACh-vermittelter Ca^{2+} -Anstieg und Insulinsekretion

In **Abb. 1.2 (III)** wird die intrazelluläre Signaltransduktion nach Stimulation der β -Zelle mit dem parasympathischen Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) dargestellt.

Die Inselorgane werden reichlich innerviert, sowohl sympathisch wie auch parasympatisch, beide Systeme sind untereinander eng verbunden (Liu et al., 1998; Sheikh et al., 1988; Verchere et al., 1996). Die Aktivierung von Nuclei vagus und ambiguus im Hirnstamm führt über die parasympathischen Fasern zur Freisetzung von ACh, aber auch von weiteren Neurotransmittern wie VIP, GRP (Bombesin), NO und PACAP (Bloom and Edwards, 1981; Gilon and Henquin, 2001; Havel et al., 1997; Knuhtsen et al., 1985; Love and Szebeni, 1999; Sha et al., 1995). In den meisten Spezies wird die

parasympathische Stimulation über die muskarinischen ACh-Rezeptoren vermittelt, da die Vorbehandlung mit dem ACh-Rezeptor-Antagonisten Atropin den Anstieg der Insulinsekretion nahezu vollständig verhindert. Die Stimulation der ACh-Rezeptoren führt zur Aktivierung des membranständigen Enzyms Phospholipase C (PLC) (Ionescu and Jeanrenaud, 1988; Rocca and Brubaker, 1999).

Schon frühzeitig gab es Hinweise für die Bedeutung des ACh für die Insulinsekretion. Es zeigte sich 10fach höhere Aktivität der Acetylcholinesterasen in Inselorganen im Vergleich zum umgebenden exokrinen Gewebe (Godfrey and Matschinsky, 1975). Auch die Expression der ACh-Rezeptoren im Pankreas und die Beteiligung der Ca^{2+} -Ionen an der Signaltransduktion wurde frühzeitig nachgewiesen (Gagerman et al., 1980; Hellman and Gylfe, 1986; Morisset et al., 1981).

Sowohl das Ca^{2+} -Signal wie auch die Insulinsekretion nach ACh-Stimulation sind glukoseabhängig. Bei niedrigen Glukosekonzentrationen lässt sich kein Ca^{2+} -Signal nachweisen, erst ab einer normoglykämischen Konzentration (5-7 mM Glukose) kommt es zu einem Ca^{2+} -Signal nach ACh-Stimulation. Bei höheren Glukosekonzentrationen bleibt ein additiver Effekt von ACh auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und die Insulinsekretion erhalten (Gilon and Henquin, 2001; Schöfl et al., 2000a).

ACh bindet sich an die ACh-Rezeptoren der β -Zelle und aktiviert das Enzym PLC, welches die Phosphodiester-Verbindung des Phospholipid-Moleküls Phosphatidylinositol-1,2-Bisphosphat (PIP_2) hydrolisiert und hierbei Diacylglycerol (DAG) und phosphoryliertes polares Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) freisetzt. Es sind insgesamt drei PLC Klassen bekannt, $\text{PLC}\beta$, $\text{PLC}\gamma$ und $\text{PLC}\delta$, wobei vor allem die $\text{PLC}\beta$ für die G-Protein vermittelte DAG- und IP_3 -Freisetzung notwendig erscheint. Auch in den Inselzellen werden vor allem die $\text{PLC}\beta$ Isozyme exprimiert (Kim et al., 2001a). Der PLC-Familie wird eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Calciumhaushaltes und der Insulinsekretion in der β -Zelle zugeschrieben (Schöfl et al., 2000b; Zawalich et al., 2004).

Bei der Hydrolyse der Phospholipide durch die PLC und der Produktion von Inositol handelt es sich um einen calciumabhängigen Prozess, so ist die Inositolproduktion bei den β -Zellen in Ca^{2+} -haltigem Medium deutlich höher als in Ca^{2+} -freiem Medium (Biden et al., 1987), auch weisen die mit einem Ca^{2+} -Chelator (BAPTA) beladenen β -Zellen eine erniedrigte IP_3 -Produktion auf (Gromada and Dissing, 1996).

Das IP_3 -Molekül diffundiert zu unterschiedlichen Zellorganellen, die die entsprechenden IP_3 -Rezeptoren exprimieren, wie rER, Mitochondrien und Nucleus (Blondel et al., 1994; Ross et al., 1989; Srivastava et al., 1999). Durch die Bindung von IP_3 an die entsprechenden Rezeptoren des rER kommt es zur Freisetzung der intrazellulär gespeicherten Ca^{2+} -Ionen (Irvine and Schell, 2001; Shears, 1998),.

Die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher führt zur Aktivierung der spannungsunabhängigen (VICC) Ca^{2+} -Kanäle und zum so genannten kapazitiven Einstrom der Ca^{2+} -Ionen aus dem extrazellulären Medium.

Die Stimulation der β -Zellen mit ACh führt zusätzlich zur Depolarisation der Zellmembran über die Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran für die Na^+ -Ionen. Es kommt zur Aktivierung der spannungsabhängigen (VDCC) Ca^{2+} -Kanäle und zum Einstrom des Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum (Gagerman et al., 1980; Gilon and Henquin, 2001; Henquin et al., 1988).

Neben IP_3 entsteht DAG im Rahmen der PIP_2 -Hydrolyse durch PLC. Es handelt sich bei DAG um eine fettlösliche Verbindung, die an die Zellmembran gebunden bleibt und Protein Kinase C (PKC) aktiviert (Hodgkin et al., 1998). DAG wird relativ schnell über Deacylierung (DAG-Lipase) oder über Phosphorylierung (DAG-Kinase) inaktiviert (Konrad et al., 1994).

Die funktionelle Bedeutung des IP_3 für den Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ist relativ gut gesichert. Die Aktivierung des PKC-Enzyms und seine Rolle in der Ca^{2+} -Freisetzung soll im Weiteren diskutiert werden.

1.4 Funktionelle Aspekte der PKC-Familie in der β -Zelle

Als PKC wird eine ganze Familie von Phosphatidylserin-bindenden Enzymen bezeichnet, die in insgesamt drei Klassen unterteilt werden (Liu and Heckman, 1998; Ohno and Nishizuka, 2002), basierend auf deren Struktur und der Fähigkeit, Aktivierungsfaktoren zu binden (**Abb. 1.3**).

Die cPKC Isoformen (α , β I, β II und γ) werden durch Ca^{2+} , DAG und die

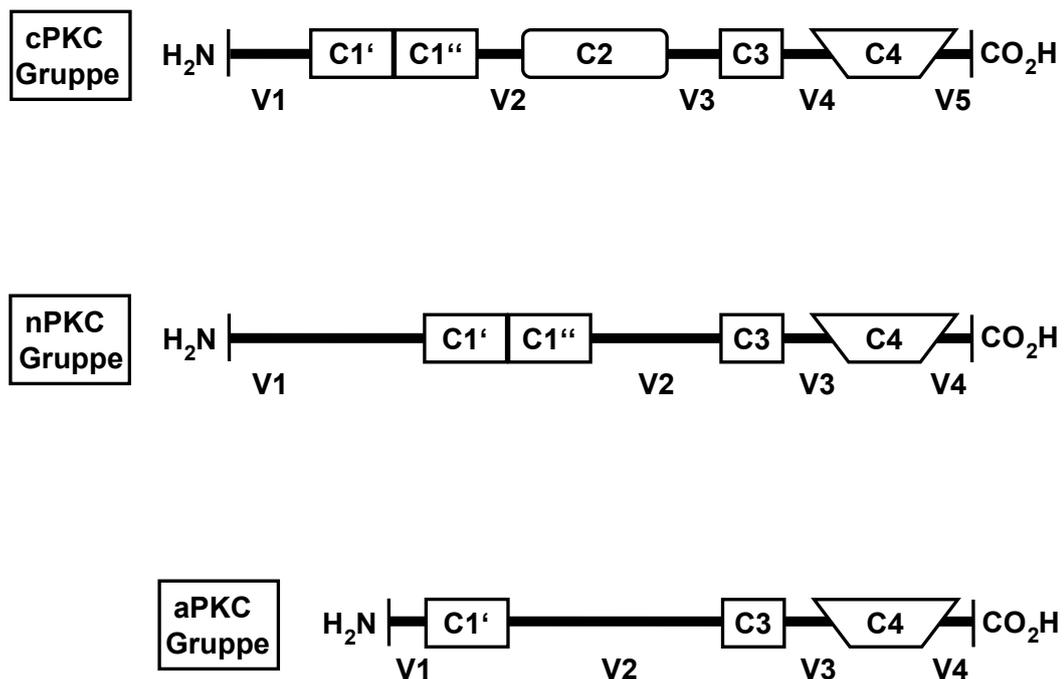


Abb. 1.3 Schematische Darstellung von katalytischen (C1-C2) und regulatorischen (C3-C4) Domänen der cPKC, nPKC und aPKC Isozyme. Hierbei werden die sogenannten konservierten Regionen (C1-C4) und variablen Regionen (V1-V5) unterschieden. C1'-Pseudosubstrat-Bindungsstelle, C1''-DAG-Bindungsstelle, C2- Ca^{2+} -Bindungsstelle, C3-ATP-Bidungsstelle, C4-Substrat-Bindungsstelle.

Membranphospholipide wie Phosphatidylserine (PS) aktiviert. Die Isozyme β I und β II entstehen durch alternatives Spleißen des gleichen Gens (Ono et al., 1987b). Den nPKC Isoformen (δ , ϵ , η , θ) fehlt die Ca^{2+} -bindende Domäne, so dass sie durch DAG und PS aktiviert werden. Die aPKC Isoformen (ζ , λ und ι) werden vor allem durch PS, aber auch durch die Phosphatidylinositide und ungesättigte Fettsäuren aktiviert (Idris et al., 2001; Inoue et al., 1977; Ono et al., 1987a; Shirai and Saito, 2002). PKC λ und PKC ι sind orthologe Isozyme, PKC λ wird vor allem in den Nagetieren

exprimiert, während PKC γ vor allem im Menschen exprimiert wird (Suzuki et al., 2003).

Obwohl die ersten Experimente, in denen die PKC-Aktivität in den nativen β -Zellen und in den insulinsezernierenden Zelllinien nachgewiesen wurde, schon vor mehr als 20 Jahren stattfanden (Tanigawa et al., 1982; Zawulich et al., 1983), bleibt die genaue Expression der PKC-Isoformen in den Inselorganen und in den β -Zellen weiterhin kontrovers. Nicht nur die unterschiedlichen Spezies weisen unterschiedliche Expressionsmuster der PKC-Isoformen auf, sondern auch die nativen β -Zellen und die Zelllinien der gleichen Spezies exprimieren teilweise unterschiedliche Isozyme. Zusätzlich waren die Antikörper in den früheren Veröffentlichungen nicht spezifisch genug, um ausreichend genau zwischen einzelnen Isoformen differenzieren zu können. In der **Tabelle 1.1** werden die Daten über Expression von PKC-Isozymen in den Inseln und den insulinsezernierenden Zelllinien zusammengefasst, basierend auf den Publikationen der letzten Jahre (Jones and Persaud, 1998; Kaneto et al., 2002; Kim et al., 2001b; Neshier et al., 2002; Tian et al., 1996).

	Inseln	β -Zelllinien
cPKC	α , β I (?), β II, γ (?)	α , β I, β II
nPKC	δ , ϵ	δ , ϵ
aPKC	ζ , λ (?)	ζ , λ , μ

Tabelle 1.1 Von den Inseln und insulin-sezernierenden β -Zelllinien exprimierte PKC-Isoformen. Die mit Fragezeichen gekennzeichneten PKC-Isozyme werden in der Literatur kontrovers angegeben

Die PKC-Isozyme zeigen eine relativ niedrige Substratspezifität, trotzdem scheinen unterschiedliche Aufgaben für die entsprechende Isozyme zu existieren. Um die spezifischen Funktionen zu ermöglichen, reagieren die PKC-Isozyme auf unterschiedliche Stimuli mit intrazellulärer Translokation zu den unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten (Newton, 2001). Sowohl in den nativen β -Zellen als auch in den β -Zelllinien kommt es zur Translokation der PKC Isoformen nach PLC-Aktivierung. Hierbei konnte vor allem für PKC α , PKC β II und PKC ϵ die stimulationsbedingte Translokation zur Zellmembran nachgewiesen werden (Pinton et al., 2002; Schaefer et al., 2004; Tang and Sharp, 1998). Auch für die Stimulation mit Glukose konnte

eine Translokation von den PKC-Isoformen in den β -Zellen zur Zellmembran (PKC α und PKC ϵ) und zum Nucleus (PKC δ und PKC ζ) nachgewiesen werden (Yedovitzky et al., 1997). Man geht heute davon aus, dass die Bewegungsrichtung der einzelnen PKC Moleküle durch spezielle Anker-Proteine vorgegeben wird, die über Rezeptoren für aktivierte PKC Isoformen verfügen, und die gezielte Translokation zum entsprechenden Ziel ermöglichen (Dorn and Mochly-Rosen, 2002; Mochly-Rosen, 1995). PKC-Isozyme können dann über die Phosphorylierung Zielmoleküle aktivieren bzw. inaktivieren. Über die genaue Beschaffenheit entsprechender Zielmoleküle ist erheblich weniger bekannt.

Während die Translokation von PKC-Isozymen dank der GFP-Technologie relativ intensiv erforscht ist, gestaltete sich die Erforschung von Zielmolekülen einzelner PKC-Isoformen deutlich schwieriger. Zu den wichtigsten Substraten der PKC-Isozyme zählen die so genannten myristoylierten alaninreichen PKC-Substrat-Proteine (MARCKS), welche ubiquitär exprimiert werden und an der Zellmembran lokalisiert sind. Die MARCKS-Proteine werden durch PKC phosphoryliert und daraufhin von der Zellmembran abgespalten, sie scheinen eine Art Shuttle zwischen der Zellmembran und dem Zytosol zu sein (Arbuzova et al., 2002; Ohmori et al., 2000). Auch in den β -Zellen werden die MARCKS-Proteine exprimiert, deren Funktion ist weiterhin unklar (Arbuzova et al., 2002; Calle et al., 1992). MARCKS können sich an das Aktin-Skelett binden und dadurch direkt die Exozytose beeinflussen (Hartwig et al., 1992).

Es existieren aber auch weitere Effekte der PKC-Isoformen, vor allem bei den membranständigen Rezeptoren und Transportproteinen. Bei den Cardiomyozyten werden die spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle durch PKC β und PKC ϵ aktiviert, es kommt zum erhöhten Ca²⁺-Einstrom in die Zellen (Huang et al., 2001; Zhang et al., 1997). In den Neuronen der Ratte kann ein PKC-abhängiger Ca²⁺-Efflux über die membranständigen Ca²⁺-ATPasen nachgewiesen werden (Usachev et al., 2002). In den Inseln der Maus mit fehlender Expression von PKC λ (β PKC λ -/- Maus) konnte eine verminderte Expressionsrate der Kir6.2- und SUR1-Komponenten des K⁺_{ATP}-Kanals bei erhöhter Insulinsekretion und erniedrigter Reaktion auf Stimulation mit Glukose nachgewiesen werden (Hashimoto et al., 2005).

Aber auch die intrazelluläre Ca^{2+} -Oszillationen scheinen von den cPKC- und nPKC-Isoformen abhängig zu sein, wie dies bei Stimulation der insulinfreisetzenden HiT15-Zellen mit AVP gezeigt wurde (Schaefer et al., 2004).

1.5 Die Interaktion zwischen PKC und dem ACh-vermittelten Ca^{2+} -Anstieg

Bei ACh handelt es sich um einen wichtigen hormonalen Stimulus für die Ca^{2+} -abhängige Insulinfreisetzung. Sowohl die ACh-induzierte Aktivierung der cPKC-Isozyme als auch die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Abhängigkeit der cPKC-Isozyme ist in den vorangegangenen Kapiteln bereits ausführlich beschrieben. Gleichzeitig existieren einige Hinweise für den Einfluss der PKC-Isozyme auf den ACh-induzierten Ca^{2+} -Anstieg in den unterschiedlichen Zelltypen.

Eine häufig angewendete Methode der PKC-Aktivierung ist die Behandlung der Zellen mit Phorbolestern wie TPA (12-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) oder PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat). Die kurzzeitige Applikation führt zur Aktivierung der cPKC- und nPKC-Isozyme, da Phorbolester hohe Affinität zu DAG-Bindungsstellen der PKC aufweisen (Easom et al., 1989). Die chronische (6-12 h) Stimulation mit Phorbolestern führt wiederum zur Degradation und weitgehenden Inaktivierung der entsprechenden PKC-Gruppen (Arkhammar et al., 1994; Tian et al., 1996).

Die kurze Stimulation der β -Zellen mit TPA unterdrückt die Produktion von Inositolphosphaten wie IP_3 (Arkhammar et al., 1994). Sowohl die Überexpression der PKC β - bzw. PKC ϵ -Isoformen als auch eine phorbolbedingte Aktivierung der PKC führt in den embryonalen Nierenzellen (HEK 293) zur Verminderung der Ca^{2+} -Oszillationen (Young et al., 2002). Zusätzlich existieren Hinweise auf schnelle Degradation von muskarinischen Rezeptoren nach Aktivierung von PKC (Liles et al., 1986). Die phorbolinduzierte Downregulation der PKC-Isoformen führt zum Anstieg der Insulinsekretion nach Stimulation mit Glukose bei marginalen Veränderungen des intrazellulären Ca^{2+} -Signals (Yaney et al., 2002; Zawalich et al., 1998). Auch die separate Inaktivierung der cPKC-Isozyme

in den Inselzellen der Ratte führt zur Erhöhung der Insulinsekretion nach Stimulation mit Kalium oder Glukose (Zhang et al., 2004). Insbesondere die Regulation von membranständigen Ca^{2+} -Kanälen wie VDCC nach Aktivierung der M_3 -Rezeptoren durch ACh scheint ein PKC-abhängiger Prozess zu sein (Love et al., 1998).

Für die einzelnen PKC-Isoformen sind folgende Mechanismen möglich, um das Ca^{2+} -Signal nach Aktivierung der muskarinischen Rezeptoren zu beeinflussen (**Abb. 1.3**):

1. Die Beteiligung der PKC-Isozyme an der initialen Phase des Ca^{2+} -Signals, verbunden mit der Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher wie rER (**A**).
2. Die Beteiligung an der späten Phase des Ca^{2+} -Anstiegs über die Interaktion mit den VICC (**C**), welche durch die Entleerung intrazellulärer Speicher aktiviert werden.
3. Die Beteiligung an der späten Phase des Ca^{2+} -Anstiegs über die Interaktion mit den VDCC (**B**), die durch die ACh-bedingte Depolarisation der Zellmembran aktiviert werden

Diese Fragen sind in den bisher stattgefundenen Experimenten nur unzureichend beantwortet. Vor allem die Zuordnung der einzelnen PKC-Isoformen erscheint als problematisch. So existieren bis heute keine spezifischen Inhibitoren oder Aktivatoren für die einzelnen PKC-Isoformen. Während die Hemmung ganzer PKC-Klassen wie cPKC oder aPKC pharmakologisch durchaus möglich ist, kann die Funktion einzelner PKC-Isoformen dadurch nur eingeschränkt beurteilt werden.

Andererseits sind auch die verfügbaren Antikörper gegen die einzelnen PKC-Isoformen nicht ausreichend selektiv. Dadurch erklären sich die vielfach widersprüchlichen Angaben zur Expression und Translokation einzelner PKC-Isoformen vor allem in den älteren Publikationen. Auch die Aktivitätssays zeigen vergleichbare Mängel. Die Anwendung der genetischen Verfahren wie die Transfektionsmethoden zur Inhibierung oder Aktivierung einzelner PKC-Isozyme ist in den nativen β -Zellen nur eingeschränkt möglich, da diese nur wenige Tage *in vitro* überleben und sich nicht direkt vermehren lassen.

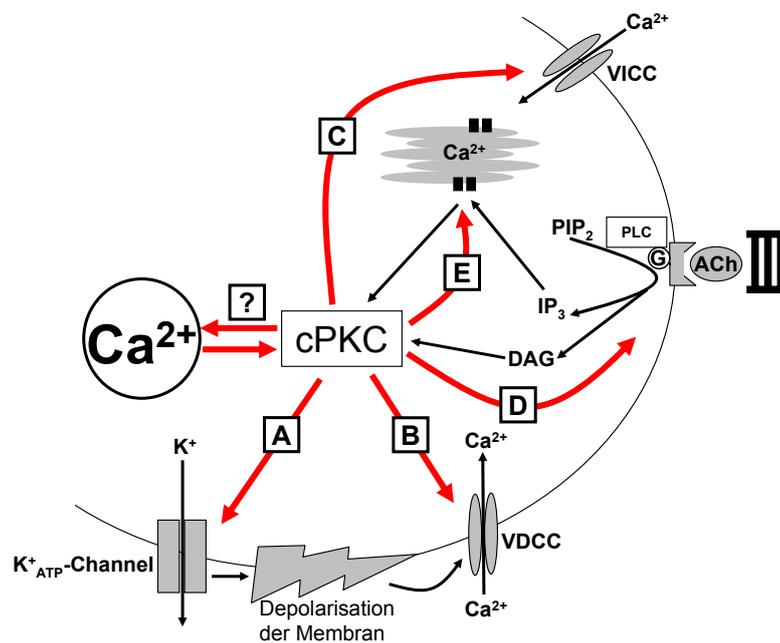


Abb. 1.3 Nach der Stimulation mit ACh und Aktivierung des IP₃/PLC-Signalweges kommt es im Rahmen eines DAG- und Ca²⁺-abhängigen Prozesses zur Aktivierung der cPKC-Isoformen. Deren Einfluss auf das Ca²⁺-Signal könnte in der β -Zelle über die Beeinträchtigung der Ca²⁺-Kanäle wie VDCC (B) und VICC (C), aber auch über die Wechselwirkung mit dem K⁺ ATP-Kanal (A) und einen rückkoppelnden Einfluss auf das ACh-Rezeptor (D) stattfinden. Intrazellulär werden Interaktionen mit rER (E) angenommen.

Insbesondere die cPKC-Isoformen scheinen aufgrund ihrer Ca²⁺-Abhängigkeit am ehesten an der Regulation des Ca²⁺-Signals der β -Zelle beteiligt zu sein. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren entschieden wir uns für ein *knock-out* Modell der Maus, um die mögliche Beeinträchtigung des ACh-abhängigen Ca²⁺-Signals durch die einzelnen cPKC-Isoformen in der β -Zelle darzustellen. Hierbei verwendeten wir sowohl die PKC α - und PKC β -defizienten Mäusestämme (PKC α -/- ggf. PKC β -/-) als auch die Mäusestämme mit einer kombinierten PKC α -/PKC β -Defizienz (PKC $\alpha\beta$ -/-), also mit einer nahezu vollständig unterdrückten Expression von cPKC-Enzymen in den β -Zellen.

1.6 Fragestellung

Die stimulationsabhängige $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung wird als zentrales intrazelluläres Signal für die Insulinfreisetzung angesehen (**Abb. 1.2** und **Abb. 1.3**).

Beim ACh-induzierten Ca^{2+} -Signal handelt es sich um keinen einfachen Reiz-Reaktions-Vorgang, wo nach der Stimulation glukoseabhängig eine entsprechende Insulinausschüttung erreicht wird, sondern um ein kompliziertes Regulationssystem aus zahlreichen miteinander verknüpften Signalwegen. Hierdurch wird die adäquate Anpassung der Insulinfreisetzung an die Anforderungen in der β -Zelle erreicht.

Die Rolle der cPKC-Isozyme für das Ca^{2+} -Signal in der β -Zelle ist bisher nicht eindeutig geklärt. Folgende Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit im Einzelnen untersucht:

1. Bei den cPKC-Isoformen PKC α und PKC β handelt es sich um die Ca^{2+} -abhängigen Enzyme. Welche Rolle spielt die fehlende Expression dieser Isozyme in den β -Zellen für das intrazelluläre Ca^{2+} -Signal nach Aktivierung der muskarinischen Rezeptoren?
2. Das intrazelluläre Ca^{2+} -Signal nach Stimulation der muskarinischen Rezeptoren kommt sowohl durch die Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aus den intrazellulären Speichern als auch durch den Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum. Wenn die PKC-Isoformen am Ca^{2+} -Signal beteiligt sein sollen, welche Mechanismen sind dabei involviert?
3. Die PKC-Isoformen zeigen eine relativ niedrige Substratspezifität. Inwieweit komplementieren sich die cPKC-Isozyme in der Regulation des Ca^{2+} -Signals in den insulinsezernierenden β -Zellen?

Ziel dieser Untersuchungen zu Veränderungen des Ca^{2+} -Signals in den β -Zellen mit fehlender PKC α - bzw. PKC β -Expression ist es, zu einem besseren Verständnis der hormonellen Steuerung der Insulinfreisetzung unter physiologischen Bedingungen beizutragen. Die Einsicht in die komplizierten Mechanismen der Signaltransduktion und Insulinsekretion ist

die notwendige Voraussetzung für die Entwicklung weiterer
Therapiekonzepte zur Bekämpfung von Diabetes Mellitus Typ 2.