

Aus dem  
Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke  
Abteilung Klinische Ernährung  
Abteilungsleiter: Prof. Dr. Andreas Pfeiffer

**CHARAKTERISIERUNG PANKREATISCHER INS-1  
INSULINOMA-ZELLEN UNTER CHRONISCH HOHER  
GLUKOSEKONZENTRATION ALS MODELL FÜR  
GLUKOSETOXIZITÄT**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doctor rerum medicarum  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von

**Isabel Göhring**

aus  
Rudolstadt

Referent: Prof. Dr. Andreas Pfeiffer

Korreferent: Prof. Dr. Wolfgang Rohde

Gedruckt mit Genehmigung der Charite – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 25. November 2008

*D*ie Wissenschaft ist voller Irrtümer, die man aber nicht zu scheuen braucht, weil sie uns trotzdem der Wahrheit näher bringen.

Aus Jules Vernes „Reise zum Mittelpunkt der Erde“

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abbildungsverzeichnis .....	VII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Diabetes mellitus .....	1
1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation .....	1
1.1.2 Lifestylefaktoren .....	2
1.1.3 Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus .....	3
1.2 Regulation der Insulinexpression in $\beta$ -Zellen des Pankreas .....	4
1.2.1 Struktur des Insulingens und Schlüsseltranskriptionsfaktoren .....	4
1.2.2 Glukosetoxizität .....	5
1.2.3 Lipotoxizität .....	7
1.3 Glukosestoffwechsel in insulin-produzierenden $\beta$ -Zellen.....	7
1.3.1 Glukosestoffwechselmetaboliten und $\beta$ -Zellfunktion .....	9
1.3.2 Oxidativer Stress und $\beta$ -Zellfunktion .....	9
1.4 Fragestellung und Zielsetzung .....	10
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Material .....	12
2.1.1 Chemikalien .....	12
2.1.2 Biochemikalien.....	13
2.1.3 Antikörper .....	13
2.1.4 Primer .....	14
2.1.5 Geräte und feste Laborinstallationen .....	14
2.1.6 Verbrauchsmaterialien .....	14
2.2 Methoden .....	15
2.2.1 Zellkultur .....	15
2.2.1.1 Kultivierungsbedingungen .....	16
2.2.1.2 Passagieren von Zellen .....	16
2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	16
2.2.2 RNA Analyse .....	17
2.2.2.1 Extraktion von Gesamt-RNA .....	17
2.2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration .....	17
2.2.2.3 Primerdesign .....	17
2.2.2.4 Quantitative real-time Reverse Transkription (RT)-PCR .....	18
2.2.2.5 Agarosegelelektrophorese .....	20

2.2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	21
2.2.3.1	Proteinisolation .....	21
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	21
2.2.3.3	SDS-PAGE .....	22
2.2.3.4	Westernblotanalyse und Antikörperbehandlung .....	23
2.2.3.5	Strippen der Westernblotmembran .....	25
2.2.4	GC-MS basierte Metabolitenprofilanalyse .....	25
2.2.5	Statistik .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1	Charakterisierung des Glukosestoffwechsels in INS-1 anhand des Metabolitenprofils .....	30
3.1.1	Optimierung der Metabolitenextraktion zur Anwendung an mammalischen Zelllinien .....	31
3.1.2	Unterscheidung von INS-1 bei 3 mM und 16 mM Glukose anhand des metabolischen Profils .....	33
3.1.3	Veränderungen im Metabolitenmuster nach chronischer Glukosestimulation .....	34
3.1.4	Zeitpunktabhängige Veränderungen von Metaboliten nach Glukosestimulation ..	38
3.1.5	Erhöhte Mengen von Glukonat im Medium von INS-1 bei 16 mM Glukose .....	40
3.1.6	Untersuchungen mit [ <sup>13</sup> C]Glukose .....	41
3.1.7	Expressionsanalysen von Glukosephosphatisomerase und 6-Phosphoglukonatdehydrogenase .....	42
3.1.8	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	43
3.2	Charakterisierung von INS-1 unter chronisch hoher Glukosekonzentration .....	43
3.2.1	Glukose steigert die Zellproliferation .....	43
3.2.2	Chronisch hohe Glukosekonzentrationen mindern die Insulin mRNA .....	44
3.2.3	Chronisch hohe Glukosekonzentrationen mindern die mRNA von Schlüsseltranskriptionsfaktoren .....	47
3.2.4	Untersuchungen zur Beteiligung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen an der Regulierung der Insulingenexpression .....	48
3.2.4.1	Proteinaktivitätsuntersuchungen .....	48
3.2.4.2	Insulin- und Transkriptionsfaktorexpression nach ERK1/2 und p38 Hemmung .....	50
3.2.4.3	Proliferationsverhalten von INS-1 nach ERK1/2 Hemmung .....	52
3.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	53
3.3	Untersuchungen zur möglichen Beteiligung des Pentosephosphatweges an der Regulierung der Insulingenexpression .....	53
3.3.1	Verminderte Insulingenexpression nach Inhibierung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase .....	53
3.3.2	Transkriptionsfaktoranalysen nach Inhibierung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase .....	55
3.3.3	Einfluss von extrazellulärem Glukonat auf die Insulingenexpression .....	56
3.3.4	Inhibierung von Monocarboxylsäuretransportern .....	56
3.3.5	Metabolische Veränderungen nach ERK1/2 Kinase Hemmung .....	57
3.3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	58

---

<b>4 Diskussion .....</b>	<b>59</b>
4.1 Chronisch hohe Glukose - induzierte metabolische Veränderungen .....	59
4.1.1 Anreicherung von Metaboliten aufgrund eines erhöhten Glukosestoffwechsels ...	59
4.2 Chronisch hohe Glukose - induzierte Verminderung der Insulingenexpression .....	62
4.2.1 $\beta$ -Zelldedifferenzierung unter chronisch hohen Glukosekonzentrationen .....	63
4.2.2 Erholung der Insulingenexpression nach ERK1/2 Inhibierung .....	65
4.3 Kritische Rolle des Pentosephosphatweges bei der Regulierung der Insulingenexpression .....	66
4.4 Mögliche ERK1/2 - abhängige Regulierung der Insulingenexpression durch Glukosestoffwechselmetaboliten .....	68
4.5 Ausblick .....	71
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>72</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>7 Danksagung .....</b>	<b>85</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

6-AN	6-Aminonikotinamid
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	complementäre DNA
C/EBP $\beta$	CAAT/enhancer binding protein $\beta$
CREB	cAMP responsive element binding-protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extrazellulär-regulierte Proteinkinase
et al.	et alii (latein): und andere
FBS	fötales Rinderserum
GLUT2	Glukosetransporter 2
h	Stunde
HNF	hepatocyte nuclear factor
IgG	Immunglobulin G
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
MODY	maturity onset diabetes of the young
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
P	Wahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

---

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDX-1	pancreatic-duodenal homeobox factor-1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SFM	Standardfehler vom Mittelwert
SAM	Standardabweichung vom Mittelwert
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS/T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung plus Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	polyoxyethylen sorbitan monolaureate, n ca. 20
(v/v)	Volumen in Volumen
(w/v)	Gewicht in Volumen



**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Geschätzte Anzahl von Diabetikern in den Staaten mit den meisten Betroffenen ...	1
Tabelle 2: Verwendete real-time RT-PCR Primer .....	14
Tabelle 3: Liste aller identifizierten Metaboliten und deren Änderung bei chronisch hohen Glukosebedingungen .....	35

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Organisation der humanen, Ratte I und II Insulin Promotorregion .....	4
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Glukose-vermittelten Insulinsekretion .....	8
Abbildung 3:	Biochemische Glukosestoffwechselwege, die ROS generieren können .....	10
Abbildung 4:	Amplifikationskurven und zugehörige Dissoziationskurven von $\beta$ -Aktin .....	18
Abbildung 5:	Semi-trockenes Transfer-Sandwich .....	24
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Metabolitenprofilanalyse von Extraktion bis Datenauswertung .....	29
Abbildung 7:	Test zur Entfernung von Medienrückständen zur Metabolitenextraktion .....	32
Abbildung 8:	Einfluss von Lösungsmitteln auf die Extrahierbarkeit von Metaboliten .....	33
Abbildung 9:	Hauptkomponentenanalyse zur Visualisierung der Metabolitenprofile von INS-1 nach chronisch niedriger und hoher Glukosestimulation .....	34
Abbildung 10:	Chronische Hyperglykämie-induzierte Veränderungen von identifizierten Metaboliten in potentiellen INS-1 Stoffwechselwegen .....	36
Abbildung 11:	Massenintensitäten von Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat nach Stimulation mit 3 mM und 16 mM Glukose .....	37
Abbildung 12:	Analyse von zellulärer Metaboliten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Glukosestimulation .....	38
Abbildung 13:	Hauptkomponentenanalyse zur Visualisierung der Metabolitenprofile von INS-1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Glukosestimulation .....	39
Abbildung 14:	Glukonat im Medienüberstand .....	40
Abbildung 15:	Massenspektren von Glukonat mit [ $^{12}\text{C}$ ]Glukose und [ $^{13}\text{C}$ ]Glukose .....	41
Abbildung 16:	Regulation der Glukosephosphatisomerase und 6-Phosphoglukonatdehydrogenase bei chronisch hoher Glukose .....	42
Abbildung 17:	Proliferationsverhalten von INS-1 bei chronisch hoher Glukose .....	44
Abbildung 18:	Dosisabhängige Regulation der Insulingenexpression durch Glukose .....	45
Abbildung 19:	Zeitabhängige Regulation der Insulingenexpression durch Glukose .....	45
Abbildung 20:	Regulation der Insulingenexpression durch andere Zucker (-alkohole) .....	46
Abbildung 21:	Regulation von $\beta$ -Zelltranskriptionsfaktoren durch Glukose .....	47
Abbildung 22:	ERK1/2 Aktivität nach Glukosestimulation .....	49

Abbildung 23: p38 Aktivität nach Glukosestimulation .....	49
Abbildung 24: JNK Aktivität nach Glukosestimulation .....	50
Abbildung 25: Insulingenexpression nach Hemmung der ERK1/2 und p38 Aktivität .....	51
Abbildung 26: Transkriptionsfaktorexpression nach Hemmung der ERK1/2 Aktivität .....	52
Abbildung 27: Proliferationsverhalten von INS-1 nach Hemmung der ERK1/2 Aktivität .....	53
Abbildung 28: Regulation der Insulingenexpression nach Hemmung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase .....	54
Abbildung 29: Boxplot zur Darstellung der Metabolitenänderung nach Hemmung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase .....	54
Abbildung 30: Genexpressionsanalysen der Transkriptionsfaktoren nach Hemmung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase .....	55
Abbildung 31: Einfluss von extrazellulär zirkulierendem Glukonat auf die Insulingenexpression .....	56
Abbildung 32: Insulingenexpression nach Hemmung der Monocarboxylsäuretransporter .....	57
Abbildung 33: Boxplot zur Darstellung der Metabolitenänderung nach Hemmung der ERK1/2 Aktivität .....	58
Abbildung 34: Modell einer möglichen ERK1/2 - beteiligten Regulierung der Insulingenexpression .....	69

# 1 Einleitung

## 1.1 Diabetes mellitus

### 1.1.1 Epidemiologie und Klassifikation

Wir leben in einer Wohlstandsgesellschaft mit reichhaltigem Nahrungsangebot, wobei Übergewicht, ernährungs- und lebensstilbedingte chronische Erkrankungen drastisch zunehmen, allen voran der Diabetes mellitus. Dabei ist der Diabetes mellitus schon lange nicht mehr nur ein Problem der reichen Industrie-Nationen, sondern nimmt auch in den Schwellenländern, die am Übergang zur Industriegesellschaft stehen, stetig zu. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, dass es die meisten Betroffenen weltweit derzeit in Indien und China gibt [1]. Die USA mit ihrem hohen Anteil Übergewichtiger und Adipöser in der Bevölkerung folgt erst auf Platz 3. Erschreckend ist aber, dass sich Deutschland mit 6,3 Millionen Betroffenen unter den Top Ten weltweit bezüglich der absoluten Zahl an Diabetikern befindet. Laut „Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2008“ der Deutschen Diabetes Union [2] wird die Zahl der Diabetiker in Deutschland im Jahre 2010 auf 10 Millionen ansteigen. Momentan kann man davon ausgehen, dass circa 8% der deutschen Bevölkerung an Diabetes leiden. Die International Diabetes Federation prognostiziert außerdem eine Erwartung von 333 Millionen Diabetikern weltweit im Jahre 2025.

**Tabelle 1:** Geschätzte Anzahl von Diabetikern in den Staaten mit den meisten Betroffenen

<b>Top Ten: Menschen mit Diabetes in der Altersgruppe 20 bis 79 Jahre (geschätzt)*</b>	
<b>2003</b>	
<b>Land</b>	<b>Millionen Menschen</b>
1 Indien	35,5
2 China	23,8
3 USA	16,0
4 Russland	9,7
5 Japan	6,7
6 Deutschland	6,3
7 Pakistan	6,2
8 Brasilien	5,7
9 Mexiko	4,4
10 Ägypten	3,9

\*Quelle: „Diabetes Atlas Second Edition Executive Summary“, IDF 2003 (Weltdiabetesverband)

Mit etwa 90% haben die meisten Betroffenen in Deutschland einen Typ-2 Diabetes. Hierbei handelt es sich um eine Störung, bei der im Anfangsstadium Insulin zwar vorhanden ist, an dem Zielgewebe aber nicht mehr richtig wirken kann (Insulinresistenz). Die Bauchspeicheldrüse kann durch Ausschüttung erhöhter Insulinmengen den Bedarf zunächst kompensieren. Bei fortschreitendem Diabetes kann die erhöhte Insulinproduktion allerdings nicht mehr aufrechterhalten werden und die benötigte Insulinmenge reicht nicht mehr aus (relativer Insulinmangel). Im Gegensatz dazu leiden nur etwa 5-10% der Diabetiker an Typ-1 Diabetes, der aufgrund meist autoimmunologisch bedingter Zerstörung der Inselzellen des Pankreas durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet ist. Andere Diabetesformen, wie der Schwangerschaftsdiabetes oder ein Diabetes der infolge einer Entzündung der Bauchspeicheldrüse oder bei bestimmten genetischen Störungen auftritt, sind zahlenmäßig weniger vertreten.

### **1.1.2 Lifestylefaktoren und Typ-2 Diabetes mellitus**

Beim Typ-2 Diabetes können genetisch bedingte und nicht-erbliche Faktoren zusammen wirken. Dass die Vererbung eine wichtige Rolle spielen kann, weiß man aus Vergleichsbeobachtungen an Zwillingen. So wird das Erkrankungsrisiko für eineiige Zwillinge von Typ-2 Diabetikern auf 63-90% geschätzt [3, 4], bei zweieiigen Zwillingen nur noch auf 20% [5]. Neben der genetischen Grundlage wird die Auslösung eines Typ-2 Diabetes entscheidend durch Übergewicht und Bewegungsmangel, Fehlernährung, Bluthochdruck und höheres Lebensalter gefördert.

Dass Übergewicht aufgrund von falscher Ernährung und zu wenig Bewegung letztendlich die Hauptursache für die Manifestation eines Typ-2 Diabetes ist, zeigt die besorgniserregende Zunahme von Typ-2 Diabetesfällen bei fast ausnahmslos adipösen Kindern und Jugendlichen. Populationsbasierte Schätzungen zur Prävalenz des Typ-2 Diabetes bei Jugendlichen und Kindern in Deutschland existieren bisher nicht. Aber eine flächendeckende Erhebung aus Baden-Württemberg schätzte eine Typ-2 Diabetes Prävalenz von 0,02/1000 in der Altersklasse von 0-20 Jahre [6]. Zahlen zur Häufigkeit des Typ-2 Diabetes in einer Gruppe von 520 stark übergewichtigen Kindern und Jugendlichen wurden ebenfalls in Südbayern erhoben [7]. Ein Hinweis auf eine Störung des Zuckerstoffwechsels fand sich bei 6,7%, bei 1,5% lag definitionsgemäß ein Typ-2 Diabetes vor. Auch wenn die Zahl der Kinder und Jugendlichen mit Typ-2 Diabetes bisher noch gering ist, ist aufgrund der Zunahme übergewichtiger Kinder mit einem Anstieg des Typ-2 Diabetes im Kindes- und Jugendalter zu rechnen. Dass diese Zunahme nicht allein durch erhöhtes Auftreten von Risikogenen hervorgerufen wird, sondern dass die Ernährung bei der Entstehung des Diabetes eine entscheidende Rolle spielt, zeigt die Tatsache,

dass in Kriegs- und Nachkriegszeiten mit Hungerperioden kaum Diabeteserkrankungen zu verzeichnen waren. Dass eine Ernährungsumstellung mit Gewichtsverlust die Diabetesentstehung verhindern kann, bestätigte sich in verschiedenen Präventionsstudien (DPP, DPS) [8-10]. Vergleichbar kommt es durch eine Gewichtsreduktion und Lebensstilumstellung aber auch beim bestehenden Diabetes zu einer deutlichen Verbesserung der Diabeteseinstellung. Aber auch Bewegung trägt entscheidend zur Diabetesprävention bei. Eine kürzlich erschienene Untersuchung aus Helsinki [11] bestätigt, dass täglich eine halbe Stunde leichte Bewegung durch Spaziergänge und Fahrradfahren, das Risiko einen Typ-2 Diabetes zu entwickeln um 36% senkt. Körperliche Anstrengungen reduzieren dieses Risiko um weitere 30%. In einer weiteren Interventionsstudie aus Finnland bei Übergewichtigen mit gestörter Glukosetoleranz führten individuelle Ernährungsberatung und körperliche Anstrengung zu deutlichem Gewichtsverlust und einem Rückgang der Diabetesmanifestation [9].

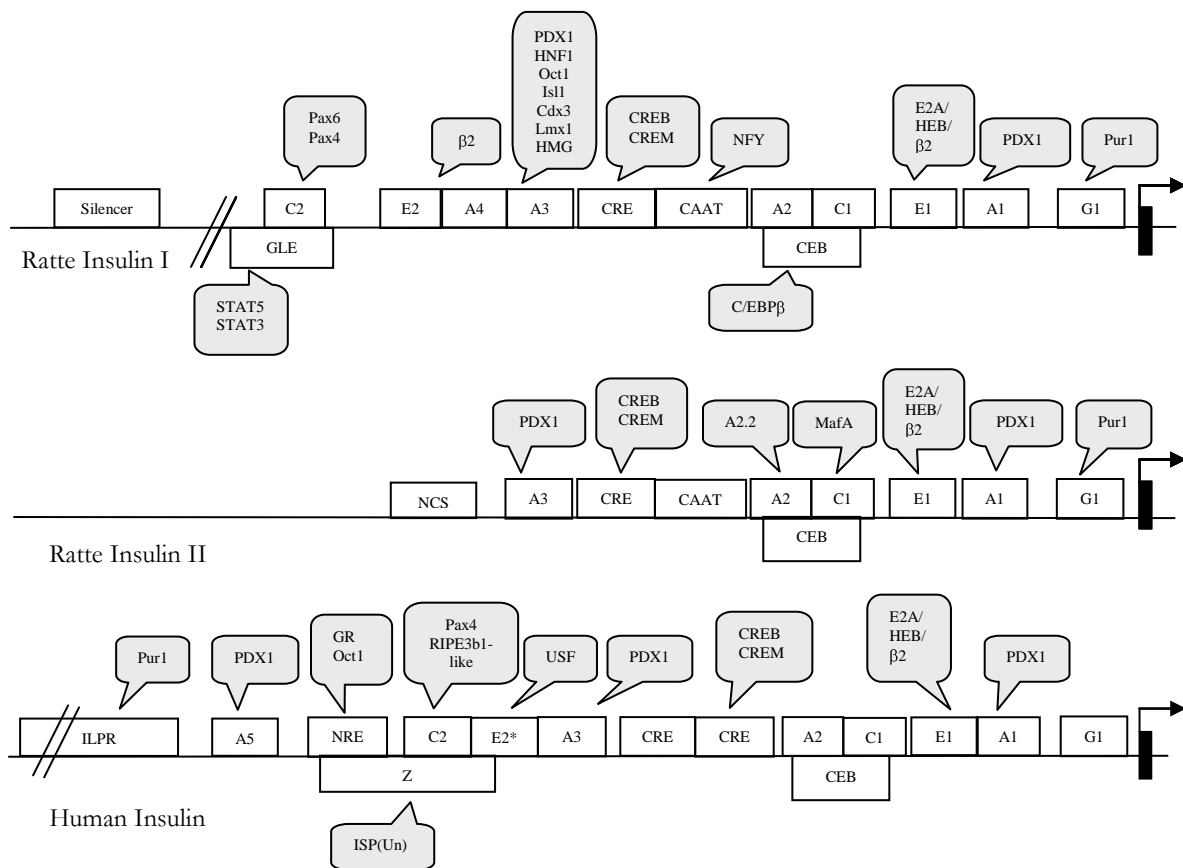
### **1.1.3 Pathogenese des Typ-2 Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus (lat.: honigsüßer Durchfluss) ist eine durch chronische Hyperglykämie (Überzuckerung des Blutes) charakterisierte endokrine Stoffwechselstörung. Die Hyperglykämie resultiert aus einer inadäquaten Insulinsekretion und/oder einer verminderten Insulinwirkung auf die Zielgewebe, was als Insulinresistenz bezeichnet wird. Bereits im prädiabetischen Zustand kann neben einer völlig normalen Glukosetoleranz eine Insulinresistenz auftreten. Um den Blutzuckerspiegel dennoch auf einem normalen Niveau zu halten, wird mehr Insulin benötigt, das heißt, die insulinproduzierenden pankreatischen  $\beta$ -Zellen reagieren mit einer kompensatorischen Hyperinsulinämie. Das Stadium der Insulinresistenz und der Hyperinsulinämie kann über Jahre hinweg bestehen. Die Hyperglykämie kann aber auch zur Desensibilisierung der  $\beta$ -Zellen und damit zur Beeinträchtigung der Funktion der Bauchspeicheldrüse führen. Die  $\beta$ -Zellen sind dann nicht mehr in der Lage ausreichend Insulin zu sezernieren, um die erhöhte Resistenz auszugleichen. Es kommt zur Manifestation des Typ-2 Diabetes. Der genaue Mechanismus der Hyperglykämie-induzierten Verringerung der pankreatischen Insulinproduktion ist noch unklar, auf die in der Literatur bisher beschriebenen Untersuchungen wird aber in den nachfolgenden Kapiteln noch näher eingegangen.

## 1.2 Regulation der Insulinexpression in $\beta$ -Zellen des Pankreas

### 1.2.1 Struktur des Insulins und Schlüsseltranskriptionsfaktoren

In adulten Säugern ist die Expression des Insulins größtenteils auf die pankreatische  $\beta$ -Zelle beschränkt, obwohl andere Zelltypen ebenfalls in der Lage sind Insulin zu synthetisieren [12, 13]. Eine hochkonservierte Region etwa 340 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle, künftig bezeichnet als Insulinpromotor, vereinigt gewebespezifische Expression und metabolische Regulation des Insulins. Viele Transkriptionsfaktoren wirken an der Promotorregion und bilden ein höchst komplexes Netzwerk, das eine präzise Regulation gewährleistet. Die entscheidendsten cis-wirkenden DNA Elemente, die *in vitro* an der transkriptionalen Aktivierung beteiligt sind, werden als A3, C1 und E1 Elemente bezeichnet [14] (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Organisation der humanen und Ratten I und II Insulin Enhancer und Promotorregion. Cis-regulatorische Elemente sind als Kästchen dargestellt. Proteine, die diese Sequenzen binden, befinden sich über dem jeweiligen Cis-Element. E2\* ist ein E2-ähnliches Element; GR = Glucocorticoidrezeptor; GLE = Gamma-Interferon-aktivierte Sequenz (GAS)-ähnliches Element; ISP(Un) = Insel-spezifisches Protein (nicht identifiziert); NRE = negativ regulatorisches Element; NCS = negativ Kontrollsequenz, Z = Z Minienhancer

PDX-1 (pancreatic-duodenal homeobox factor-1) ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der Homöobox-Proteine, der an die A3-Box des Insulogens bindet [15]. PDX-1 ist außerdem unentbehrlich für die normale Entwicklung des Pankreas, denn dessen Deletion führt zu kompletter Agenesie [16]. PDX-1 interagiert mit Proteinen der bHLH- (basic helix-loop-helix) Familie, welche an die E1-Box binden [17]. Der E1 Aktivator ist ein Heterodimer, bestehend aus ubiquitären Klasse A (E12/E47 und E2/5) und den auf die  $\beta$ -Zelle beschränkten Klasse B ( $\beta$ 2) Mitgliedern der bHLH-Familie [18]. Das Zusammenspiel zwischen PDX-1 und bHLH-Proteinen bedingt Interaktionen mit anderen DNA-bindenden Proteinen [19] und Co-Aktivatoren [20]. Auf diese Weise entsteht ein einzigartiges Netzwerk von Protein-Protein und Protein-DNA Interaktionen. Als C1-Aktivator, wurde MafA aus der Maf-Familie identifiziert [21]. Obwohl eine Reihe weiterer Proteine, wie Mitglieder der HNF- (hepatic nuclear factor) [22], PAX- (paired box) [23] und Nkx-Familie [24] bei dem integrierten Netzwerk von Transkriptionsfaktoren, welche die Insulintranskription regulieren, mitwirken, PDX-1,  $\beta$ -2 und MafA scheinen die Hauptregulatoren der Insulintranskription unter normalen und pathologischen Bedingungen zu sein.

### 1.2.2 Glukosetoxizität

Glukose ist der wichtigste physiologische Regulator der pankreatischen  $\beta$ -Zellfunktion und reguliert Insulingenexpression, Insulinbiosynthese und Insulinsekretion. Glukose reguliert alle Schritte der Insulingenexpression, einschließlich Transkription, prä-mRNA Splicing und mRNA Stabilität. A3, E1 und C1 sind die wichtigsten Transkriptionskontrollelemente des Insulogens nach Glukoseantwort. Glukose fördert die Bindung von PDX-1 zur A3-Box [15]. Zusätzlich geht eine PDX-1 Stimulation mit einer Rekrutierung des Co-Aktivatoren p300 [25] einher, was die Chromatinstruktur durch post-translationale Veränderungen der Histone beeinflusst [26, 27]. Allerdings kann Glukose auch inhibierend auf die Insulinsekretion und die Insulingenexpression wirken und das  $\beta$ -Zellüberleben beeinträchtigen, wenn diese über einen längeren Zeitraum hinweg erhöhten Glukosekonzentrationen ausgesetzt sind. Dieses Phänomen wird in der Literatur als Glukosetoxizität bezeichnet [28].

Diverse Untersuchungen belegen, dass chronisch erhöhte Glukosekonzentrationen sowohl in pankreatischen Zelllinien, als auch in isolierten Inseln vom Menschen und bei Versuchstieren die Insulinsynthese und Insulinsekretion vermindern. 1992 beobachteten Davalli et al. [29] in humanen Inseln erstmals, dass eine zweitägige Kultur dieser bei erhöhten Glukosekonzentrationen eine bis zu 90% verminderte Glukoseantwort bei maximaler Glukosestimulation zur Folge hat. Ebenfalls resultierte eine chronisch hohe Glukoseexposition in



humanen Inseln in einer Verringerung des Insulingehalts und geringerer Insulintranskription [30]. *In vitro* Studien mit der  $\beta$ -Zelllinie HIT-T15 zeigten, dass chronisch hohe Glukosespiegel eine verminderte Proinsulin mRNA-Expression und Insulinpromotoraktivität zur Folge hatten [31]. Die beeinträchtigte Insulingenexpression wird mit einer verringerten Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren PDX-1 und MafA an den Insulinpromotor assoziiert [32]. Die Abnahme der PDX-1 Bindungsaktivität wird zum einen in Zusammenhang mit einer Verminderung der mRNA-Spiegel gebracht [30] und weiteren Untersuchungen zufolge reguliert das PDX-1 Protein seine Transkription möglicherweise selbst [33]. Die verminderte Bindungsaktivität von MafA wird durch einen Verlust der MafA Proteinexpression erklärt [34, 35], wobei die mRNA-Spiegel unverändert bleiben.

Neben der Beobachtung, dass es zu einer Verminderung der Expression wichtiger Transaktivatoren des Insulingens kommt, zeigten Lu et al., dass der Repressor C/EBP $\beta$  (CCAAT/Enhancer-binding protein  $\beta$ ) in der  $\beta$ -Zelllinie INS-1 unter chronisch hohen Glukosebedingungen verstärkt exprimiert wird [36]. Eine Hochregulation von C/EBP $\beta$  konnte auch *in vivo* bei diabetischen Ratten nachgewiesen werden [37]. Es wurde außerdem berichtet, dass C/EBP $\beta$  eine direkte Bindung mit Transkriptionsfaktor E47 eingeht und damit die Bildung des  $\beta$ 2/E47 Aktivorkomplexes verhindert [36]. Aktuellere Untersuchungen demonstrierten, dass C/EBP $\beta$  die Bindung von MafA an den Insulinpromotor verhindert und damit möglicherweise die Induktion der Transkription durch Zusammenwirken von MafA und  $\beta$ 2 verhindert [38].

Weiterhin wird diskutiert, dass Glukosetoxizität zur Dedifferenzierung der  $\beta$ -Zelle führt. Zum Beispiel ist der Proliferationsfaktor c-myc auf RNA-Ebene in diabetischen Tieren deutlich hochreguliert [39]. Kaneto et al. [40] haben herausgefunden, dass c-Myc außerdem die Insulintranskription durch Konkurrieren mit  $\beta$ 2 um die E-Bindungsstelle inhibieren kann. Um also möglicherweise die Funktionalität der  $\beta$ -Zelle zu sichern, wird die fürs Überleben nicht-essentielle Insulingentranskription herunterreguliert, um die notwendige Proliferation zu gewährleisten.

Welche Signalwege an der Glukose-induzierten Verminderung der Insulingenexpression beteiligt sind, ist nicht genau geklärt. Es wird vermutet, dass zellulärer Stress dabei eine zentrale Rolle spielt. Verschiedene Kinasen, darunter die Stress-aktivierte Proteinkinase c-Jun N-terminal kinase (JNK), die p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase und die Proteinkinase C (PKC) sind bekannt bei oxidativem Stress [41, 42] oder hohen Glukosekonzentrationen [41, 43, 44] in verschiedenen Zellsystemen aktiviert zu werden. Extrazellulär-aktivierte Proteinkinasen (ERK) können

ebenfalls durch Glukosestimulation aktiviert werden [44, 45] und sind außerdem an der Regulation einer Reihe von Transkriptionsfaktoren beteiligt [46].

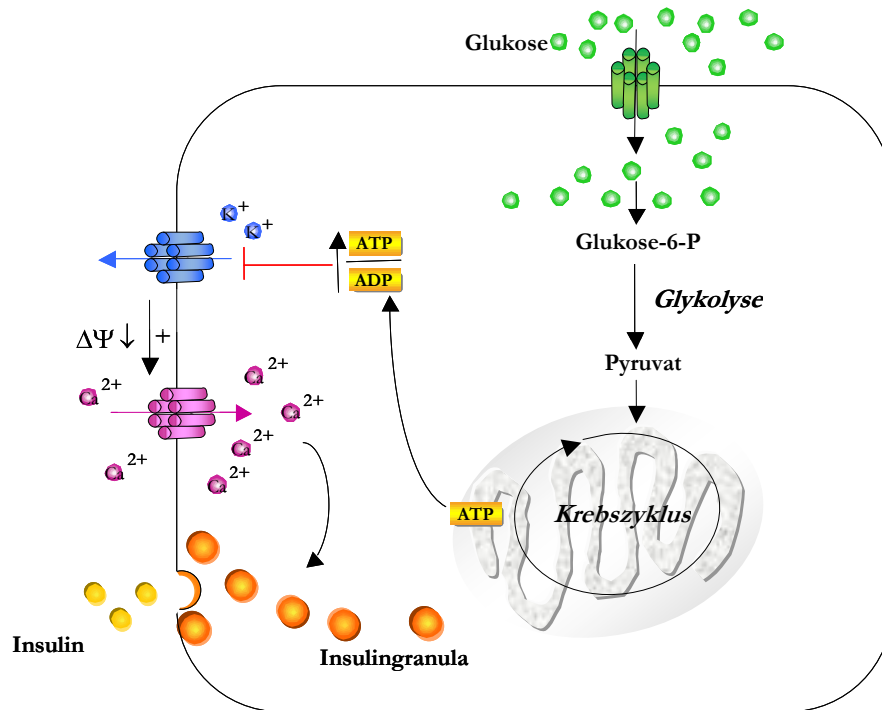
### 1.2.3 Lipotoxizität

Ähnlich beeinflussen auch chronisch erhöhte Fettsäurespiegel die  $\beta$ -Zellfunktion negativ durch einen Prozess, den man als Lipotoxizität bezeichnet [47]. Anhand verschiedener Untersuchungen mit isolierten Inseln und insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zelllinien konnte gezeigt werden, dass erhöhte Fettsäurekonzentrationen im Medium bei gleichzeitig hohen Glukosekonzentrationen die Insulingenexpression beeinträchtigen. Eine verminderte Insulingenexpression wird mit einer erhöhten Akkumulation von intrazellulären Triglyceriden assoziiert [48]. Allerdings geht man von keiner direkten Inhibierung der Insulingenexpression aus, da eine erhöhte Triglyceridsynthese durch Überexpression des Enzyms Diacylglycerolacyltransferase zwar die Insulinsekretion hemmt, die Präproinsulin-mRNA Spiegel aber unverändert bleiben [49]. Man vermutet jedoch, dass spezifische Fettsäuren einen inhibierenden Effekt auf die Insulin-mRNA haben. So konnte gezeigt werden, dass Palmitat, nicht aber Oleat die Insulingenexpression hemmt [50]. Der lipotoxische Effekt von Palmitat ist von Inkubationsdauer und Konzentration abhängig [51]. Es ist hervorzuheben, dass die nachteiligen Effekte von Palmitat auf die Insulingenexpression und -sekretion in  $\beta$ -Zellen nur bei gleichzeitiger Exposition dieser mit hohen Glukosekonzentrationen zu beobachten waren. So trat eine Palmitat-induzierte Akkumulation von  $\beta$ -Zell Triglyceriden nur bei Hyperglykämie auf [48]. Diese *in vitro* Ergebnisse machen kenntlich, dass Lipotoxizität nur zusammen mit Glukosetoxizität auftritt. Glukosetoxizität allerdings kann unabhängig von Lipotoxizität vorkommen.

## 1.3 Glukosestoffwechsel in insulin-produzierenden $\beta$ -Zellen

Der Glukosestoffwechsel in  $\beta$ -Zellen nimmt eine wichtige Rolle bei der Induktion der Insulinsekretion ein. Basierend auf Beobachtungen in Inseln und  $\beta$ -Zelllinien muss Glukose verstoffwechselt werden, damit Insulin sezerniert werden kann [52-54]. In Abbildung 2 ist die Glukose-vermittelte Insulinsekretion schematisch dargestellt. Ein Anstieg des  $\beta$ -Zellglukosestoffwechsels wird nach Eintritt von Glukose in die  $\beta$ -Zelle durch eine erhöhte Aktivität der Glukokinase hervorgerufen, dem für die Glukosephosphorylierung verantwortlichen Enzym [55]. Es gibt auch Untersuchungen, die zeigen, dass der Glukoseverbrauch steigt, wenn Glukoseoxidierung und Glukoseflux zunehmen. Letzterer wird

durch die Pyruvatcarboxylase und die Neubildung von Zwischenprodukten des Krebszyklus in den Mitochondrien (Anaplerose) ausgelöst [56]. Außerdem ist die Verstoffwechslung von Glukose für die mRNA-Synthese wichtig, um durch Insulinneusynthese den Vorrat an verbrauchtem Insulin zu ersetzen.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Glukose-vermittelten Insulinsekretion in  $\beta$ -Zellen. Glukose equilibriert durch die Plasmamembran und wird durch Glukokinase phosphoryliert. Entstehendes Glukose-6-Phosphat wird weiter in der Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt, welches in den Krebszyklus eingeht. Im Mitochondrium entsteht ATP, was in das Zytosol transportiert wird und einen Anstieg des zytosolischen ATP/ADP- Verhältnisses zur Folge hat. Dies bewirkt die Schließung der K<sub>ATP</sub> – Kanäle und eine Depolarisation der Zellmembran ( $\Delta\Psi$ ). Dadurch öffnen sich die Spannungs-abhängigen Ca<sup>2+</sup> – Kanäle und einströmendes Ca<sup>2+</sup> erhöht die cytosolische Ca<sup>2+</sup> Konzentration, welche die Insulinsekretion initiiert.

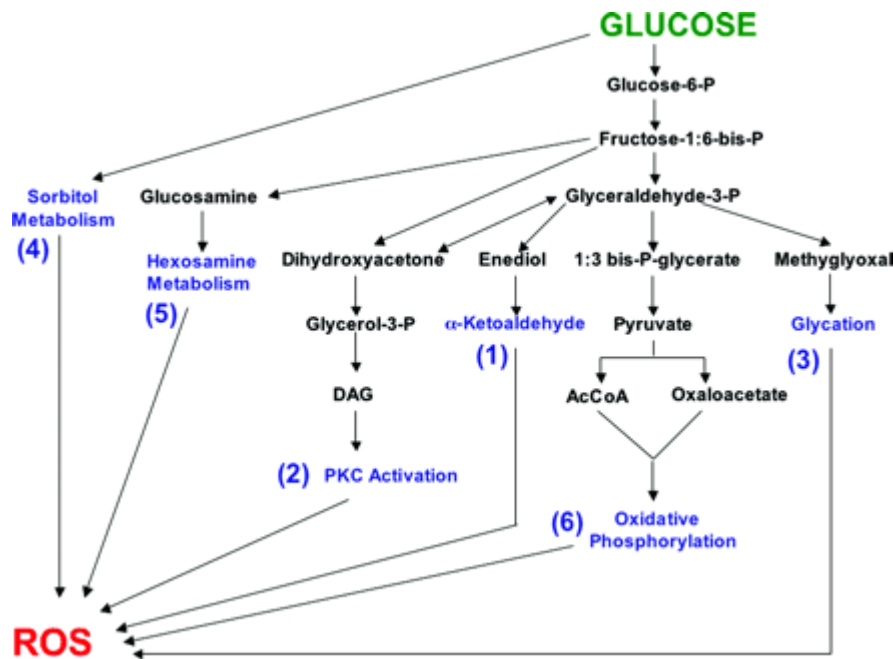
Wie schon unter Abschnitt 1.2 "Dysregulation der pankreatischen Insulinexpression und -sekretion" erwähnt führt eine chronisch hohe Glukoseexposition zur Beeinträchtigung der  $\beta$ -Zellfunktion. Wie ist es nun möglich, dass exzessive Mengen an Glukose, dem wirksamsten physiologischen Stimulus der Insulinproduktion überhaupt, genau diesen Prozess über längere Zeit inhibieren? Obwohl vermutet wird, dass Veränderungen im Glukosestoffwechsel dabei eine zentrale Rolle spielen könnten, gibt es wenige Untersuchungen, die diese Annahmen belegen. Es gibt bisher zwei unterschiedliche Versuchsansätze, um die glukose-induzierte Beeinträchtigung der  $\beta$ -Zellfunktion zu klären. Auf diese wird nachfolgend eingegangen.

### 1.3.1 Glukosestoffwechselmetaboliten und $\beta$ -Zellfunktion

Zum einen wird vermutet, dass Veränderungen von Glukosestoffwechselmetaboliten die Insulinregulation beeinflussen. Da extrazelluläre Fettsäuren wie unter 1.3.2 "Lipotoxizität" beschrieben die Insulinproduktion verschlechtern, nahmen Roche et al. an, dass aufgrund des gesteigerten Glukosemetabolismus verstärkt intrazelluläre Fettsäuren gebildet werden könnten [57]. Tatsächlich konnten sie eine erhöhte enzymatische Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase und der Fettsäuresynthase nachweisen. Außerdem waren die Spiegel von Citrat und Malonyl-CoA erhöht und Glukose wurde verstärkt zu Lipiden verarbeitet. Des Weiteren war die Fettsäureoxidation vermindert. Nach Stoffwechsellinhibitoruntersuchungen von Brock et al. dagegen gehen diese davon aus, dass ein glykolytischer Metabolit oberhalb der Triosephosphate D-Glyceraldehyd und Dihydroxyaceton die Dysregulation der Insulinantwort hervorruft [58]. Eine Involvierung des Glukosemoleküls per se schließen die Autoren aber aus, da eine Inhibierung der Glukokinase die Insulinregulation nicht beeinträchtigt.

### 1.3.2 Oxidativer Stress und $\beta$ -Zellfunktion

Zum anderen wird vermutet, dass die Entstehung von oxidativem Stress, aufgrund des langanhaltenden erhöhten Glukosestoffwechsels eine Rolle bei der Entstehung von Glukosetoxizität spielt. Das ist von großer Bedeutung, da Inseln im Vergleich zu anderen Geweben ein schwaches antioxidatives Verteidigungssystem besitzen [59]. So konnte gezeigt werden, dass chronisch hohe Glukosekonzentrationen einen Anstieg reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) und Superoxide in isolierten Inseln zur Folge haben [60]. In Abbildung 3 sind die Glukosestoffwechselwege dargestellt, die vermehrt ROS bilden können. Allerdings ist in  $\beta$ -Zellen noch gar nicht gezeigt worden, dass der Glukoseflux in den in Abbildung 3 dargestellten Stoffwechselwegen 1-5 "kritisch" erhöht ist. Bisherige Untersuchungen beschränkten sich auf besonders Hyperglykämie-anfällige Zelltypen, wie kapillare Endothelzellen der Retina, renale Mesangialzellen, Neuronen und Schwannzellen des peripheren Nervensystems, die in einem detaillierten Review von Brownlee dargestellt wurden [61, 62]. Diese Zellen können die zelluläre Glukoseaufnahme unter hyperglykämischen Bedingungen nicht schnell genug reduzieren, so dass sich kritische Glukosemengen intrazellulär anreichern.



**Abbildung 3:** Biochemische Glukosestoffwechselwege, die ROS generieren können (übernommen von Robertson [63]). 1) Enolisierung und  $\alpha$ -Ketoaldehydgenerierung; 2) PKC-Aktivierung; 3) Dicarbonylbildung und Glykierung; 4) Sorbitolmetabolismus; 5) Hexosaminmetabolismus; 6) Oxidative Phosphorylierung

Da die  $\beta$ -Zellen Glukose insulinunabhängig aufnehmen [64], wäre auch hier ein Anstieg intrazellulärer Glukosekonzentrationen unter chronischen hyperglykämischen Bedingungen kritisch. Eine Umleitung exzessiver Mengen an Glukose in andere Stoffwechselwege als die Glykolyse wäre in  $\beta$ -Zellen daher auch denkbar und wird im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

#### 1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Es gibt bisher wenige Daten, die zeigen, welche Glukosestoffwechselwege unter chronisch hohen Glukosebedingungen in der  $\beta$ -Zelle fehlreguliert werden und welche Signalwegskaskaden aktiviert beziehungsweise deaktiviert werden und letztendlich für eine Änderung der Insulingenexpression und dessen Schlüsseltranskriptionsfaktoren mitverantwortlich sind.

Das Ziel dieser Arbeit war es, am Modell der differenzierten Insulinoma-Zelllinie INS-1 die Verminderung der Insulingenexpression nach chronisch hoher Glukoseexposition näher zu untersuchen. Das Endziel ist es in diesem Zusammenhang eine Verbindung zwischen verändertem Glukosemetabolismus und der Verminderung der Insulingenexpression zu knüpfen.

Die Arbeit gliedert sich in zwei Teilziele:

### **1. Untersuchungen zum Glukosemetabolismus**

Auf Gaschromatographie-Massenspektrometrie basierte Metabolitenprofilanalysen sollten dazu dienen Veränderungen einer Vielzahl intrazellulärer Metaboliten simultan zu untersuchen, um aus dem Glukosemetabolismus resultierende Veränderungen auf die Regulation der Insulingenexpression übertragen zu können.

### **2. Beteiligung möglicher Signalwege and der Regulation der Insulingenexpression**

Eine mögliche Beteiligung spezifischer Proteinsignalwege an der Regulierung der Insulingenexpression und  $\beta$ -zellspezifischer Transkriptionsfaktoren ließe sich aus deren Hemmung durch spezifische Inhibitoren und den daraus entstehenden Funktionsausfällen ableiten.

Letztlich soll diese Arbeit dazu beitragen, der Antwort auf die Frage näher zu kommen, wie chronisch hohe Glukosekonzentrationen die Insulinexpression beeinträchtigen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

Da bestimmte Materialien, Reagenzien und Lösungen im Zusammenhang mit ihrem Verwendungszweck im Methodenteil erwähnt sind, werden hier nur allgemeine Reagenzien, Materialien und Laborinstallationen sowie Geräte aufgelistet.

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Arginin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bisacrylamid	Sigma, Saint Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue G	Serva, Heidelberg, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Calbiochem, La Jolla, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Edeka, Potsdam, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma, Saint Louis, USA
Tris Base	Merck, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Sigma, Saint Louis, USA
Tris Acetat	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.2 Biochemikalien

6-AN (6-Phosphoglukonatdehydrogenaseinhibitor)	Sigma, Saint Louis, USA
Aprotinin	Sigma, Saint Louis, USA
Biotinylierte Proteinleiter	Cell Signaling, Beverly, USA
BSA	Sigma, Saint Louis, USA
Calyculin A	Cell Signaling, Beverly, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette	Roche, Mannheim, Deutschland
DNS 100 bp Leiter und 6X Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Saint Louis, USA
Leupeptin	Sigma, Saint Louis, USA
PD98059 (ERK1/2 Inhibitor)	Calbiochem, La Jolla, USA
PMSF	Boehringer, Mannheim, Deutschland
SB202190 (p38 Inhibitor)	Sigma, Saint Louis, USA

### 2.1.3 Antikörper

#### Primärantikörper

Polyclonaler Anti-Aktin (Kaninchen)	Sigma, Saint Louis, USA
HRP-gekoppelter Anti-Biotin	Cell Signaling, Beverly, USA
Polyclonaler Anti-p38 (Kaninchen)	Cell Signaling, Beverly, USA
Monoclonaler Anti-P-p38 (Kaninchen)	Cell Signaling, Beverly, USA
Polyclonaler Anti-ERK1/2 (Maus)	Cell Signaling, Beverly, USA
Monoclonaler Anti-P-ERK1/2 (Maus)	Cell Signaling, Beverly, USA
Polyclonaler Anti-JNK (Kaninchen)	Cell Signaling, Beverly, USA
Monoclonaler Anti-P-JNK (Kaninchen)	Cell Signaling, Beverly, USA

#### Sekundärantikörper

Ziege HRP-gekoppelter Anti-Kaninchen IgG	Cell Signaling, Beverly, USA
Pferd HRP-gekoppelter Anti-Maus IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA



### 2.1.4 Primer

**Tabelle 2:** Verwendete real-time RT-PCR Primer (synthetisiert von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Name	Stromaufwärts	Stromabwärts
<b>β-Aktin</b>	5'-CGTGAAAAGATGACCCAGATCA-3'	5'-CACAGCCTGGATGGCTACGT-3'
<b>β2</b>	5'-CCAAAGCCACGGATCAATCT-3'	5'-TGCGAATGGCTATCGAAAAGA-3'
<b>C/EBPβ</b>	5'-TCGGGACTTGATGCAATCC-3'	5'-GCAGGAACATCTTTAAGTGATTACTCA-3'
<b>c-myc</b>	5'-GGTGAAAAACCGACAGTCA-3'	5'-CCGAGTCGTAGTCGAGGTCATAGT-3'
<b>Insulin1&amp;2</b>	5'-TTTGTCAAACAGCACCTTTGTG-3'	5'-CTCCACCAGCTCCAGTTGT-3'
<b>MafA</b>	5'-ACTGGCCATCGAGTACGTCAA-3'	5'-GCAGGCGGTGGCAGAA-3'
<b>Nkx6.1</b>	5'-GGAGAAGACTTTCGAACAAACGA-3'	5'-GGAACCAGACCTTGACCTGACT-3'
<b>PAX6</b>	5'-GTTTTTCAGAGCCACGTAATCGA-3'	5'-ACAAAAGACACCACCAAGCTGATT-3'
<b>PDX-1</b>	5'-CGGACATCTCCCCATACG-3'	5'-AAAGGGAGATGAACGCGG-3'

### 2.1.5 Geräte und feste Laborinstallationen

Elektrophoreseapparatur	Biorad, Hercules, USA
Gel Imager Fujifilm	Fuji Foto Film Co. Ltd, Japan
GeneQuant RNS/DNS Calculator	Amersham, Freiburg, Deutschland
Inkubator	Heraeus, Düsseldorf, Deutschland
Sterilwerkbank	Heraeus, Düsseldorf, Deutschland
Ultraschallgerät Labsonic® L	B. BraunBiotech, Melsungen, Deutschland
Ultraschallwasserbad Sonorex	Bandelin, Berlin, Deutschland
Wallac Victor 2 1420 Multilabl Counter	Wallac, Turku, Finnland
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuumbenzentrifuge Savant Speed Vac SPD 111V	Novodirect (Thermo), Kehl, Deutschland

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Mikrotiterplatten 96-Well	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
PVDF Membran (Immobilon-P, 0,45 µm Poren)	Millipore corporation, Bedford, USA
Whatmann 3 MM Filterpapier	Schleicher & Schöll, Dassel, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturtestplatten (6-Well, 96-Well)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen (10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

- Zelllinie:

INS-1

Prof. Dr. C. Wollheim, Genf, Schweiz

- Medien und Lösungen:

RPMI 1640 (mit L-Glutamin)

Gibco BRL, Gaithersburg, USA

RPMI 1640 (mit L-Glutamin, ohne Glukose)

BioWhitacker, Heidelberg, Deutschland

FBS

Gibco BRL, Gaithersburg, USA

Tavanic

Aventis, Frankfurt (Main), Deutschland

Trypsin/EDTA

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

10 X PBS (ohne Magnesium, ohne Calcium)

Gibco BRL, Gaithersburg, USA

- Kultiviermedium: RPMI 1640 (mit L-Glutamin), enthält 11 mM Glukose  
10% FBS  
10 mM HEPES  
1 mM Pyruvat  
0,5% Tavanic  
50  $\mu$ M Mercaptoethanol
- Stimulationsmedium: RPMI 1640 (mit L-Glutamin), ohne Glukose  
3 mM beziehungsweise 16 mM Glukose  
10% FBS  
10 mM HEPES  
1 mM Pyruvat  
0,5% Tavanic  
50  $\mu$ M Mercaptoethanol

### **2.2.1.1 Kultivierungsbedingungen**

INS-1 Zellen wurden bei 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C in RPMI 1640 (mit 2 mM L-Glutamin) mit Zusatz von 10% hitzeinkubiertem FBS, 10 mM HEPES, 1 mM Pyruvat, 0,5% Tavanic und 50 µM Mercaptoethanol in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Kultiviermedium erneuert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt und verwendete Lösungen sowie Materialien waren keimfrei.

Während der Durchführung von Experimenten wurden die INS-1 Zellen in gewünschter Zellzahl in 10 cm Schalen für Metaboliten- und Proteinextraktion beziehungsweise in 6-Well Platten für RNA Isolation ausgesät. Nach 3 Tagen wurden die Zellen in RPMI 1640 mit 3 mM Glukose für 24 h vorinkubiert. Anschließend wurden sie für 48 h beziehungsweise für die in den Abbildungen angegebene Zeit in Stimulationsmedium kultiviert.

### **2.2.1.2 Passagieren von Zellen**

Konfluente Zellen wurden nach Entfernen des Mediums einmal mit 1X PBS gewaschen und für 2 min mit Trypsinlösung bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in frischem Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung auf neue Kulturgefäße verteilt.

### **2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden nach Entfernen des Mediums einmal mit 1X PBS gewaschen und trypsiniert und circa 1-3 Mio Zellen wurden in Kultiviermedium mit 10% DMSO aufgenommen. Anschließend wurden sie bei 20°C eingefroren. Zur Langzeitlagerung wurden sie am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Im Anschluss daran wurden sie in ein Kulturgefäß überführt und in frischem Medium aufgenommen. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

## 2.2.2 RNA Analyse

### 2.2.2.1 Extraktion von Gesamt RNA

- DMPC-behandeltes Wasser: 1% (v/v) DMPC  
50% (v/v) Ethanol

Zur Isolation von Gesamt-RNA wurden INS-1 Zellen in 6-Well Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen einmal in 1X PBS gewaschen und mit 1 ml TRIZOL Reagenz von Invitrogen lysiert. Die weitere Aufreinigung der RNA aus INS-1 Zellen wurde, wie im Herstellerprotokoll beschrieben, durchgeführt. Die Resuspension des RNA Pellets erfolgte mit 10  $\mu$ l DMPC-Wasser. Die RNA wurde bis zur weiteren Nutzung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Messung der RNA Konzentration erfolgte an einem UV-VIS Spektrophotometer Gene Quant der Firma Pharmacia. Dazu wurden die Proben 1:50 auf ein Endvolumen von 100  $\mu$ l mit DMPC-Wasser verdünnt. Die Messung wurde in Quarzküvetten ( $d = 10$  mm) gegen DMPC-Wasser als Vergleichsprobe bei  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 280$  nm durchgeführt. Dabei galt:

$$1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} \approx 30 \mu\text{g/ml RNA}$$

Die Reinheit der Probe wurde durch den Quotienten  $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$  bestimmt. Der Quotient bei sauberer RNA beträgt 2,0.

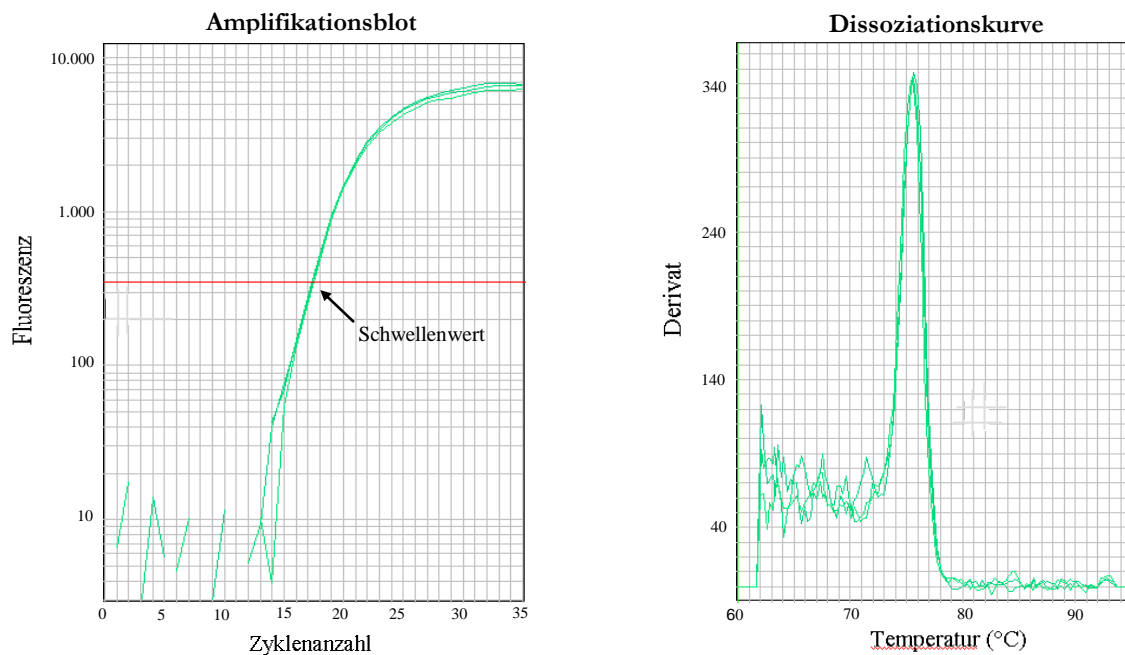
### 2.2.2.3 Primerdesign

Die mRNA-Sequenzen wurden aus der GenBank Datenbank des International Center for Biotechnology Information (NCBI) des National Institute of Health (NIH) über das Internet bezogen. Die Primer wurden mit der Software Primer Express 2.0 entworfen. Die maximale Länge des Amplifikats betrug 150 bp. Enthielt das Gen mehr als ein Exon, wurden die Primer intronüberspannend entworfen, um eine spezifische Amplifikation zu gewährleisten.

### 2.2.2.4 Quantitative real-time Reverse Transkription (RT) - PCR

#### *Prinzip*

Die real-time PCR funktioniert im Prinzip wie eine standardmäßige PCR, jedoch wird dem Reaktionsansatz der Fluorophor SYBR<sup>®</sup>Green zugegeben, der die Eigenschaft besitzt, unspezifisch in Doppelstrang-DNA zu interkalieren. Die real-time PCR erlaubt damit eine Echtzeitmessung des ansteigenden Fluoreszenzsignals mit jedem PCR-Zyklus. Die Fluoreszenz nimmt also proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Die Zunahme der Ziel-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Nach Korrektur der Hintergrundfluoreszenz, wird der Anstieg der Fluoreszenz für jeden einzelnen Zyklus in einem Amplifikationsplot (Abbildung 4) dargestellt.



**Abbildung 4:** Amplifikationskurven und zugehörige Dissoziationskurven von  $\beta$ -Aktin (Proben-triplets)

Die in dieser Arbeit dargestellten Genexpressionsanalysen wurden mittels „One-Step“ real-time RT-PCR durchgeführt. Dies bedeutet, dass die Resultate auf mRNA-Mengen basieren. Dafür wurde bei allen Reaktionen aus INS-1 Zellen isolierte RNA mit einer Konzentration von 10 ng/ $\mu$ l als Template eingesetzt. Bei dem „One-Step“ Verfahren wird während des Reaktionsverlaufs, vor der eigentlichen Amplifikation der DNA, die RNA mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dadurch können Fehler bei der Reversen Transkription und nichtlineare RNA-Umschreibung in cDNA reduziert werden.

### ***Schmelzkurvenanalyse des PCR-Produkts***

Nach abgelaufener PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die charakteristische Dissoziationstemperatur der PCR-Produkte und damit die Spezifität bestimmt werden kann. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen und dann die Temperatur langsam erniedrigt. Bei einer für jede Sequenz spezifischen Temperatur bildet sich aus den Einzelsträngen wieder ein Doppelstrang, was einen Fluoreszenzanstieg zur Folge hat. Je nach Länge des Produkts entsteht ein spezifischer Schmelzkurvenverlauf (Abbildung 4), der eine Unterscheidung zwischen spezifischem Produkt und der Bildung von Primer-Dimeren beziehungsweise Kontamination zulässt. Bei jedem Versuch wurden sowohl eine Negativkontrolle ohne Template zum Monitoring von Primer-Dimeren und Verunreinigungen, als auch eine (-) RT Kontrolle ohne Reverse Transkriptase, bei der nur ein Produkt durch vorhandene genomische oder cDNA entsteht, mitgeführt.

### ***Durchführung***

Für den Reaktionsansatz wurde der QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR Kit der Firma Qiagen verwendet. Ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 5 µl war wie folgt zusammengesetzt:

3,00 µl	2X SYBR® Green Mastermix
0,04 µl	Reverse Transkriptase Mix
0,36 µl	Rnase-freies Wasser
0,30 µl	Senseprimer (5 µM)
0,30 µl	Antisenseprimer (5 µM)
1,00 µl	RNA (10 ng/µl)

Die Proben wurden in 384-Well Platten pipettiert und die Reaktion lief im real-time PCR Cycler „7900 HT Sequence Detection System“ der Firma Applied Biosystems mit folgendem Temperaturprofil ab:

1) Reverse Transkription:	20 min	50°C	
2) Aktivierung der Hot-Start <i>Taq</i> -Polymerase:	15 min	95°C	
3) PCR: Denaturierung	15 s	95°C	} 30-40 Zyklen
Primerannealing und Extension	1 min	60°C	
4) Schmelzkurvenanalyse:	15 s	95°C	
	15 s	60°C	
	15 s	95°C	

### ***Relative Quantifizierung und Normalisierung***

Zur Normalisierung sowie relativen Quantifizierung der Daten wird eine interne Kontrolle benötigt. Eine interne Kontrolle kann ein Gen-Transkript sein, dessen Signal verwendet wird, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Weil die Gesamtanalyse auf diesem Signal basiert, ist die Wahl der internen Kontrolle ein wichtiger Aspekt des Experiments. Die Expression der internen Kontrolle sollte nicht als Antwort auf die experimentelle Behandlung variieren.

### ***Berechnung mit Hilfe der Standardkurve***

Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem Schwellenwert  $C_t$ . Ist die Ausgangsmenge einer Probe bekannt, kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den  $C_t$  konstruiert werden. Durch die Geradengleichung  $x = (C_t - b)/m$  ( $m$  = Steigung der Geraden,  $b$  = y-Achsenabschnitt) kann an der Standardkurve für jede unbekannte Probe der Logarithmus der mRNA Menge bestimmt werden. Alle Proben werden normalisiert, indem die errechnete mRNA Menge des Zielgens durch die mRNA Menge des internen Kontrollgens geteilt wird:

Relative Genexpression (normalisiert) = mRNA Menge Targetgen / mRNA Menge Kontrollgen

#### **2.2.2.5 Agarosegelelektrophorese**

- 50X Tris-Acetat-EDTA (TAE) Laufpuffer: 2 mM Tris-Acetat  
0,05 M EDTA, pH 8

Zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse wurden die real-time RT-PCR Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Fragmentlänge und die Spezifität der Primer zu prüfen. Für die Trennung von DNA wurden 3%ige horizontale Agarosegele verwendet. Dazu erhitzte man eine entsprechende Menge Agarose bis zur vollständigen Schmelze in 1X TAE-Laufpuffer. Um die DNA mittels UV-Licht zu visualisieren wurde das Gel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Triplets einer real time RT-PCR Probe wurden gepoolt und 15 µl der Probe wurden mit 3 µl DNA Probenpuffer (6X) verdünnt und anschließend bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Standard wurden 3 µl einer 100 bp Leiter verwendet, von der zuvor 0,5 µl mit 0,5 µl DNA Probenpuffer (6X) versetzt und auf 3 µl mit Aqua dest. aufgefüllt wurden. Die DNA Banden wurden mittels Gel Imager visualisiert.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 Proteinisolation

- Lysepuffer: 7 M Harnstoff  
2 M Thioharnstoff  
40 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethan  
65 mM Chaps  
130 mM DTT
- Proteaseinhibitoren: 1 Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette
- Phosphataseinhibitoren: 50 nM Calyculin A  
1 mM PMSF  
1 mM Natriumorthovanadat

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C und mit gekühlten Lösungen durchgeführt. Nach Entfernen des Mediumüberstandes wurden die Zellen in 10 cm Testkulturplatten zweimal mit 1X PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter Zuhilfenahme eines Zellschabers in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 200 µl Lysepuffer, welchem kurz zuvor die Phosphataseinhibitoren zugegeben wurden, lysiert. Danach wurden die Zellen einer Ultraschallbehandlung unterzogen (5 s bei 100 Watt, 10 s Pause, 3 Wiederholungen) und die Zellsuspension bei 14000 rpm, 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

### 2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

- Bradfordreagenz: 10% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
4,75% (v/v) Ethanol  
0,01% (w/v) Coomassie Blue G250

Im Anschluss an die Proteinextraktion erfolgte die Messung der Gesamtproteinkonzentration der Probe. In einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 1 µl der Probe im Bereich zwischen 0,5 µg/µl und 4 µg/µl Protein mit 250 µl Färbereagenz gemischt. Weiterhin pipettierte man in der gleichen Weise verschiedene Verdünnungen eines BSA Standards (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; und 4,0 µg/µl), der im gleichen Puffer wie das zu messende Protein gelöst war. Als Blindwert wurde nur Lysepuffer pipettiert. Nach 2 min wurde die Proteinkonzentration der Proben im Wallac Multilabl Counter



bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595 \text{ nm}$  gemessen. Das im Bradfordreagenz enthaltene Coomassie Brilliant Blue bindet im saueren Milieu an die Proteine und bewirkt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm. Die Absorptionszunahme bei 595 nm ist ein Maß für die Gesamtproteinkonzentration der Lösung.

### 2.2.3.3 SDS-PAGE

- Proteinprobenpuffer (4X):
  - 200 mM Tris HCl (pH 6,8)
  - 400 mM DTT
  - 8% (w/v) SDS
  - 0,4% (w/v) Pyronin Y
  - 40% (v/v) Glycerin
- Proteinlaufpuffer (10X pH 6,8):
  - 2 M Glycin
  - 250 mM Tris Base
  - 1% (w/v) SDS
- Acrylamidlösung (30%) :
  - 29,2% (w/v) Acrylamid
  - 0,8% (w/v) Bisacrylamid
- Trenngel (10%):
  - 375 mM Trispuffer (pH 8)
  - 10% (v/v) Acrylamidlösung
  - 1% (w/v) SDS
  - 1% (w/v) Ammoniumpersulfat
  - 0,07% (v/v) TEMED
- Sammelgel (5%):
  - 63 mM Tris buffer (pH 6)
  - 5% (v/v) Acrylamidlösung
  - 0,1% (w/v) SDS
  - 0,1% (w/v) APS
  - 0,1% (v/v) TEMED

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung isolierter Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Für die Elektrophorese wurden 12%ige diskontinuierliche Gele in Kombination mit einer vertikalen Elektrophoresekammer verwendet.

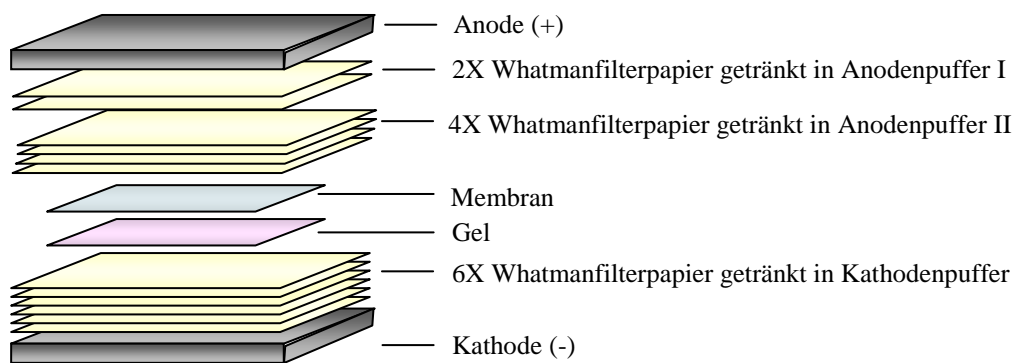
Die aufzutrennenden Proteinextrakte wurden im Verhältnis 1:4 mit 4X Proteinprobenpuffer vermischt und 5 min bei 95°C denaturiert. 30 µg Protein wurden auf das Gel aufgetragen und die Auftrennung erfolgte in der mit Proteinlaufpuffer gefüllten Kammer bei einer konstanten Spannung von 100 V pro Gel.

#### 2.2.3.4 Westernblot und Antikörperbehandlung

- Kathodenpuffer: 100 mM Arginin  
0,01% (w/v) SDS
- Anodenpuffer 1: 300 mM Tris Base  
20% (v/v) Methanol
- Anodenpuffer 2: 20 mM Tris Base  
20% (v/v) Methanol
- TBS/T Puffer: 100 mM Tris Base  
1,5 M NaCl  
0,5% (v/v) Tween 20
- Blockierlösung: 5% (w/v) Milchpulver in TBS/T

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines semi-trockenen Systems elektrophoretisch auf eine hydrophobe Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Der Transfer und die Detektion der Proteine wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Das, die Proteine enthaltene, Polyacrylamidgel wird in Nachbarschaft zu der PVDF-Membran gebracht, die zuvor ein paar Sekunden mit absolutem Methanol aktiviert und anschließend in Aqua dest gespült wurde. Vorder- und Rückseite des Gels wurden mit verschiedenen Puffer-getränkten Whatmannfilterpapieren (Abbildung 5) bedeckt und das Transfer-Sandwich zwischen zwei Graphitplatten platziert. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte 50 min bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA.



**Abbildung 5:** Semi-trockenes Transfer-Sandwich

2. Nach dem Proteintransfer auf die Membran wurde diese mit 1X TBS gespült und anschließend 1 h in Blockierlösung inkubiert, um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern. Der Molekulargewichtsmarker wurde nicht blockiert und verblieb in TBS/T.
3. Die Membran wurde dann mit 1X TBS/T gespült und über Nacht bei 4°C mit Erstantikörper in 5% BSA-Lösung und in geeigneter Konzentration inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran zweimal mit TBS/T gespült, danach 15 min und zuletzt 2 mal 5 min in TBS/T gewaschen. Auch während der Erstantikörperbehandlung verblieb der Marker in TBS/T.
4. Als Zweitantikörper wurde ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter Antikörper in geeigneter Konzentration in 5%iger Milchpulverlösung verdünnt und die Proben damit 1 h bei RT inkubiert. Der biotinylierte Marker wurde gleichzeitig mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Anti-biotin Antikörper bei einer Verdünnung von 1:1000 behandelt. Die Membran wurde darauffolgend zweimal mit TBS/T gespült und dann 15 min und zuletzt 4 mal 5 min in TBS/T gewaschen.
5. Die Immunreaktion wurde mit dem chemilumineszierenden Substrat Luminol sichtbar gemacht, indem man die Membran 1 min mit den Reagenzien LumiGLOreagent und Peroxidase im Verhältnis 1:2 inkubiert. Die Aufnahme der Lichtemission mittels Fuji Gel Imager ermöglichte die Visualisierung der Proteinbanden. Die Analyse der Proteinmenge erfolgte densitometrisch mittels AIDA software.

### 2.2.3.5 Strippen der Western Blot-Membran

- Stripping Puffer: 50 mM Tris, pH 6,8  
100 mM Mercaptoethanol  
2% (w/v) SDS

Zum Entfernen von Primär- und Sekundärantikörpern und zur anschließenden Zweitdetektion von Zielproteinen auf der Western Blot-Membran, wurde diese in einem luftdichtverschlossenen Behältnis für 20 min bei 50°C in ausreichend Stripping Puffer geschwenkt. Danach wurde die Membran in 1X TBS gespült und zweimal 10 min in 1X TBS gewaschen. Nach dem Stripping konnte die Membran einer weiteren Behandlung mit Antikörpern unterzogen werden.

### 2.2.5 Metabolitenprofilanalyse

In Kooperation mit dem Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie wurde im Hinblick auf Unterschiede im Stoffwechsellmuster ein breites Spektrum von intrazellulären niedermolekularen Metaboliten in INS-1 Zellen nach Stimulation mit physiologischen und supraphysiologischen Glukosekonzentrationen untersucht.

#### *Chemikalien*

Chloroform für Chromatographie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol für Chromatographie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methoxaminhydrochlorid	Sigma, Saint Louis, USA
N,N-Dimethylformamid-diethylacetal (DMF)	Sigma, Saint Louis, USA
Fettsäuremethylester (FAMES)	Sigma, Saint Louis, USA
N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA)	Sigma, Saint Louis, USA
Ribitol als interner Standard	Sigma, Saint Louis, USA

#### *Equipment*

Gaschromatograph 6890N	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Pegasus 3 TOF Massenspektrometer	Leco, St. Joseph, MI, USA
Pegasus 4 TOF Massenspektrometer	Leco, St. Joseph, MI, USA
ChromaTOF Software 1.61 für Pegasus 3	Leco, St. Joseph, MI, USA
ChromaTOF Software 3.25 für Pegasus 4	Leco, St. Joseph, MI, USA

### ***Zellkultivierung***

INS-1 Zellen wurden in 10 cm Schalen in RPMI1640 Medium mit 11 mM Glukose kultiviert. Vor der Stimulation mit 3 mM oder 16 mM Glukosemedium für 48 h wurden die Zellen für 24 h in 3 mM Glukosemedium gehalten. Um nachzuvollziehen, welche gemessenen Metabolite aus dem Glukoseabbaustoffwechsel resultieren, wurde [<sup>12</sup>C]Glukose durch [<sup>13</sup>C]Glukose ersetzt.

### ***Extraktion***

Die Zellen wurden nach Stimulation 3 mal mit eiskalter 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden anschließend unter Zuhilfenahme eines Zellschabers in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Nach dem Wiederauftauen wurden zum Pellet sofort 500 µl einer -20°C kalten Extraktionslösung (Methanol:Chloroform:Aqua dest. im Verhältnis 2,5:1:1) mit 7,2 µM Ribitol als internen Standard zugegeben. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 5 min in einem Ultraschallbad sonifiziert und danach bei 4°C, 14000 rpm für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische 2 ml Eppendorfgefäße überführt, vakuumgetrocknet und bei -20°C bis zur Derivatisierung gelagert. Das gerade beschriebene Vorgehen zur Extraktion der Metaboliten bedurfte zuvor einiger Optimierungsschritte, die im Ergebnisteil unter 3.1.1 „Optimierung der Metabolitenextraktion zur Anwendung an mammalischen Zelllinien“ dargestellt sind.

### ***Derivatisierung***

Um schwer verdampfbare oder leicht zersetzliche Substanzen gaschromatographisch zu erfassen, ist deren Derivatisierung notwendig. Dabei werden stark polare Gruppen in weniger polare umgewandelt. Die gebildeten Derivate zeichnen sich durch eine erhöhte Flüchtigkeit und durch eine größere thermische Stabilität aus. Für GC-tofMS wurden die vakuumgetrockneten Proben in 10 µl Methoxaminhydrochlorid in Pyridin (40 mg/ml) gelöst und bei 30°C für 90 min unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach wurden zu den Proben 90 µl des Reagenz MSTFA (enthielt 10 µl/ml FAMES als interne Standards) zugegeben, um polare funktionelle Gruppen zu derivatisieren und diese bei 37°C für 30 min inkubiert.

### ***Injektionsparameter***

1 µl Probe wurde bei einer Temperatur von 45°C, welche um 4°C/s auf 230°C anstieg, durch eine Splitless-Injektion auf die Kapillarsäule gebracht. Die Injektion wurde von einem programmierbaren Autosampler vorgenommen. Als Trägergas diente Helium, dessen Gasstrom auf 2 ml/min festgelegt war.

### ***Chromatographie***

Die Chromatographie am Gaschromatograph 6890N wurde mit 30 m MDN-35 Kapillarsäulen ( $\phi$  320  $\mu$ m) durchgeführt. Die Temperatur sollte für 210 s bei 85°C isotherm sein, darauffolgend auf 360°C um 15°C/min ansteigen und 230 s bei 360°C verbleiben.

### ***Massenspektrometrie***

Im Flugzeitmassenspektrometer wurden die zuvor gaschromatographisch aufgetrennten Substanzen durch eine Elektronenstoßionisation fragmentiert. Das jeweilige Fragmentierungsmuster wurde dann zur Substanzidentifizierung herangezogen. Die Wechselspannung wurde so gewählt, dass nur Ionen mit  $m/z$  80 bis  $m/z$  500 mit 20 Scans/s detektiert wurden. Zur Messung der Fettsäuren wurden die Proben mit dem Leco Pegasus 3 TOF Massenspektrometer, gekoppelt an einen 6890N Gaschromatograph und einem Dual-Arm Autosampler mit automatischer Derivatisierung und Lineraustausch, analysiert. Das eliminiert zum einen das Auftreten möglicher Degradierungs- und/oder Syntheseartefakte und zum anderen Probenverschleppung, was bei unpolaren Verbindungen, wie Fettsäuren auftreten kann. Da zelluläre Fettsäuren keine signifikante Rolle in INS-1 zu spielen schienen (Ergebnisteil 3.1.3), wurden die Proben daraufhin mit dem Leco Pegasus 4 TOF Massenspektrometer, gekoppelt an einen 6890N Gaschromatograph, analysiert. Dafür wurden die Proben zuvor manuell derivatisiert.

### ***Datenprozessierung***

Die Metabolitenprofilanalyse führt zu komplexen Chromatogrammen, charakterisiert durch koeluiierende Komponenten. Obwohl das ein Problem ist, kann dieses teilweise durch Dekonvolution der Chromatogramme behoben werden. Die Herstellersoftware ChromaTOF verfügt über einen geeigneten Algorithmus Spektren zu dekonvolvieren. Diese dekonvolvierten Spektren können als exportierte Textdateien weiter prozessiert werden.

### ***Retentionszeit Index***

Der Retentionszeit Index (RI) ist wahrscheinlich der wichtigste Parameter für die Peakzuordnung. Es ist äußerst wichtig, dass jedes Chromatogramm separat für die Retentionszeit korrigiert wird. Folgender Algorithmus wird angewandt:

- 1) Identifizierung der Retentionszeit von jedem internen Standard und Zuordnung eines festgelegten RI zu dem jeweiligen Peak.

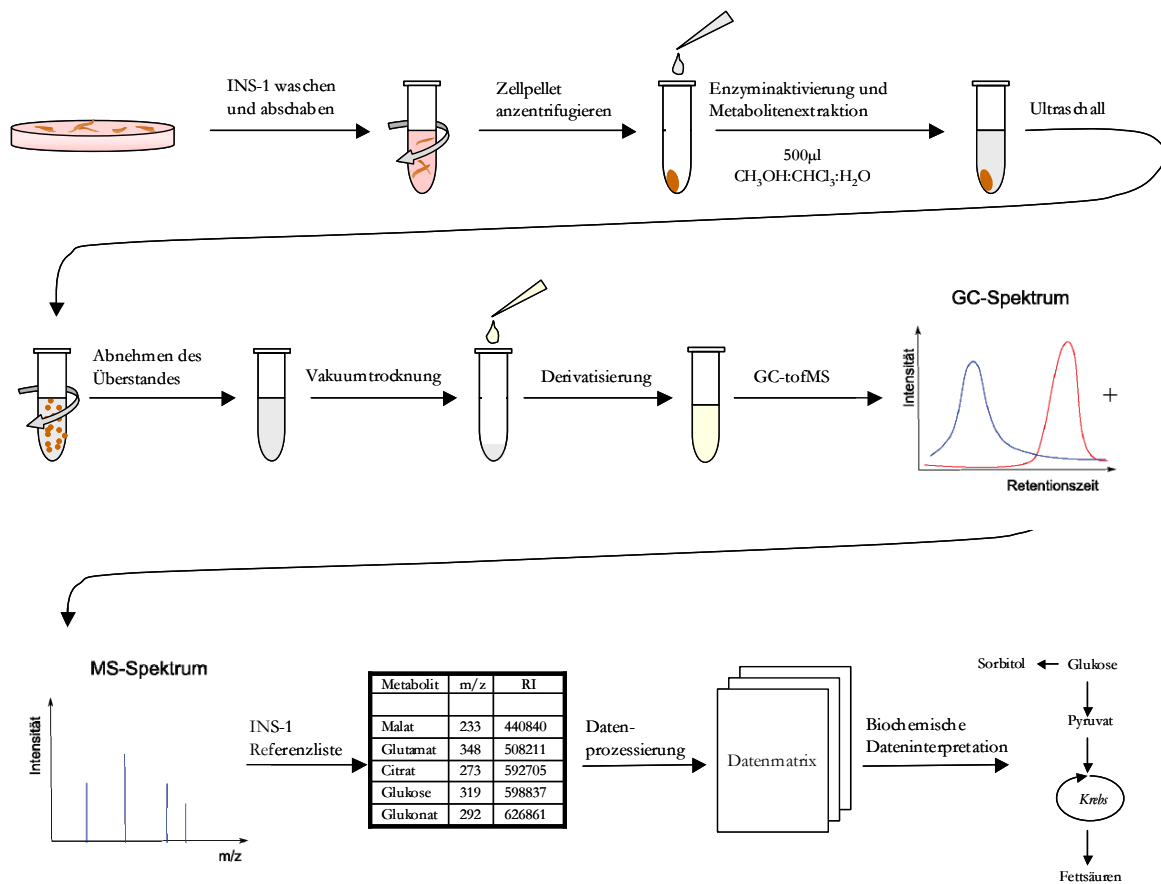
- 2) Berechnung der RI für alle Moleküle die zwischen zwei Standards eluieren, mit Hilfe von linearer Interpolation.
- 3) Verlängerung der Linearen zur Berechnung der RI aller Komponenten, die vor oder nach dem letzten Standard eluieren.

### ***Peakzuordnung***

Mit Hilfe eines Skripts, entwickelt am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie [65], wird jedem Peak eine Substanz mit bekannter oder unbekannter chemischer Struktur zugeordnet. Die Zuordnung ist hauptsächlich abhängig vom RI und dem Massenspektrum. Die Identifikation einer Substanz erfolgte über einen Vergleich mit kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen über eine am MPI selbst angelegte Metabolitenbibliotheksdatenbank. Zusätzlich wurde ein Vergleich der Massenspektren über das Computerprogramm AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) des National Institute of Standards and Technology (NIST) herangezogen.

### ***Rohdatenbearbeitung***

Die ermittelte Peakhöhe wurde relativ zum internen Standard Ribitol dargestellt. Durch die Extraktion mit Methanol und Chloroform werden nichtzelluläre Substanzen aus Kunststoffverbrauchsmaterialien und andere Laborkontaminationen unvermeidlich mitextrahiert. Aus diesem Grund wurden bei jedem Versuchsansatz Blindproben (Proben ohne Zellen unter den eingesetzten Kultivierungsbedingungen und von den eingesetzten Plastikmaterialien) generiert. Metaboliten, welche in den mitgeführten Blindproben in gleichen Mengen wie in INS-1 Extrakten detektiert wurden, sind von der Analyse ausgeschlossen worden. Außerdem wurden Metaboliten mit mehr als 50% Fehlwerten einer Kultivierungsbedingung aus der Analyse ausgeschlossen, vereinzelte Fehlwerte durch Berechnung des Median der Variablen ersetzt. Anschließend wurden die Daten für die Zellzahl korrigiert.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Metabolitenanalyse von Extraktion bis Datenauswertung

### 2.2.6 Statistik

Alle Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, unabhängig voneinander in Triplika durchgeführt, wobei bei Durchführung jedes Experiments ebenfalls mindestens drei voneinander unabhängige Proben für jede Kultivierungsbedingung analysiert wurden. Eine Überprüfung der Signifikanz  $p$  der Übereinstimmung zweier Verteilungen wurde im Fall einer Normalverteilung der Werte mit Hilfe des parametrischen Student's T-Tests und bei Abweichung von der Normalverteilung mit Hilfe des parameterfreien Mann-Whitney-U Tests ermittelt. Signifikanz liegt vor, wenn  $p < 0,05$  ist.



### 3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in 3 Teilabschnitte:

- 1 Metabolitenanalysen zur Untersuchung der Verstoffwechslung von Glukose in  $\beta$ -Zellen
- 2 Analyse von Proliferation, Insulingenexpression und wichtigen Schlüsseltranskriptionsfaktoren beziehungsweise Signalkaskaden unter chronisch hohen Glukosekonzentrationen in INS-1
- 3 Analyse der Faktoren, die potentiell eine Verknüpfung zwischen verändertem Glukosemetabolismus und Regulierung der Insulingenexpression darstellen

#### Auswahl des Modellsystems

Als *in vitro*-Modell kam die pankreatische Ratten-Insulinomazelllinie INS-1 zum Einsatz. In der Diabetesforschung haben Nager- $\beta$ -Zelllinien bisher ihre Nützlichkeit bewiesen und bis eine humane clonale  $\beta$ -Zelllinie verfügbar ist, stellen sie wertvolle  $\beta$ -Zellmodellsysteme dar. Die meist genutzten Insulin-sezernierenden  $\beta$ -Zelllinien sind RIN [66], HIT [67], beta TC [68], MIN-6 [69] und INS-1 [70] Zellen. Diese Zellen exprimieren hauptsächlich Insulin und nur geringe Mengen an Glukagon und Somatostatin. RIN Zellen, den Subklon RIN-38 ausgenommen, weisen eine schwache sekretorische Antwort auf Glukose auf [71, 72]. HIT und beta TC Zellen, den Subklon beta TC-6 F7 ausgenommen, sezernieren Insulin nach Glukosestimulation, aber deren Dosis-Antwort Kurve ist deutlich nach links verschoben [73]. Dagegen behalten INS-1, MIN-6 und beta TC-6 F7 Zellen eine weitgehend normale Glukose-induzierte Insulinsekretion unter physiologischen Bedingungen bei.

#### 3.1 Charakterisierung des Glukosestoffwechsels in INS-1 anhand des Metabolitenprofils

Die Metabolitenprofilanalyse spielt in Ergänzung zur funktionellen Genom- und Proteomanalyse bei der Entdeckung von Biomarkern, der Aufklärung von Signalwegsbeziehungen und Krankheitsmechanismen eine wichtige Rolle. Es konnte bereits dargestellt werden, dass mittels Metabolitenprofilen „verdeckte“ Phänotypen unterschieden werden können, wo Genexpressionsanalysen diesen Unterschied nicht so deutlich darstellen konnten [74]. Metabolomics fand außerdem Anwendung bei der Identifizierung von „stillen Mutationen“

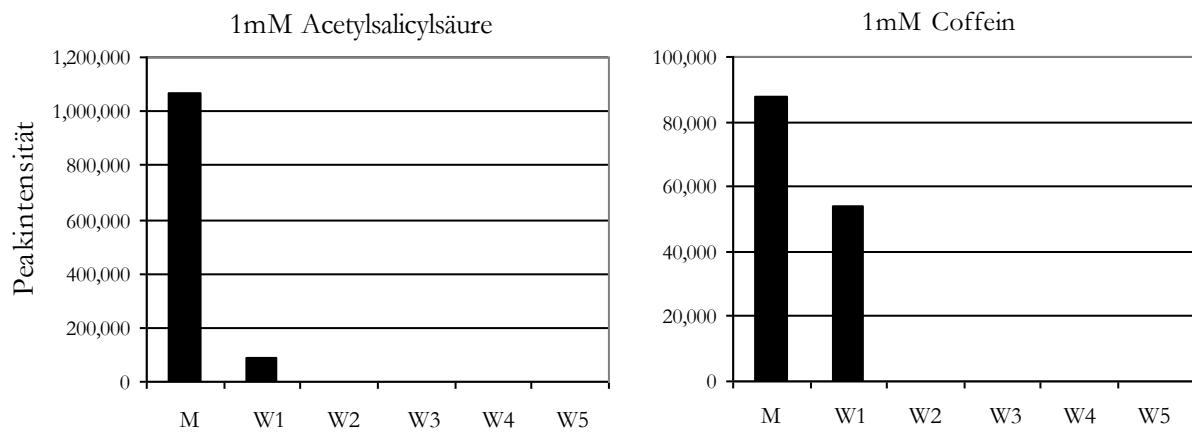
innerhalb des Genoms von *S. cerevisiae*, die keinen offensichtlichen Phänotyp verursachten, aber ein unterschiedliches Metabolitenprofil zur Folge hatten [75]. Metabolitenprofilanalysen in der  $\beta$ -Zelllinie INS-1 sollten zunächst detailliertere und auch bisher unerkannte Veränderungen des Glukosestoffwechsels unter chronisch hyperglykämischen Bedingungen aufzeigen. Diese Anwendung sollte außerdem verdeutlichen, dass durch die simultane Messung einer Vielzahl von Metaboliten ein pathologisches Stoffwechselprofil erstellt werden kann.

### **3.1.1 Optimierung der Metabolitenextraktion zur Anwendung an mammalischen Zelllinien**

Ein Protokoll zur Extrahierung von Metaboliten aus pflanzlichen Systemen wurde von Fiehn et al. publiziert [76]. Die Extraktion von Metaboliten aus mammalischen Zellen bedurfte einiger Optimierungsschritte, auf die im Nachfolgenden näher eingegangen wird.

#### ***Reduktion von möglichen Kontaminationen***

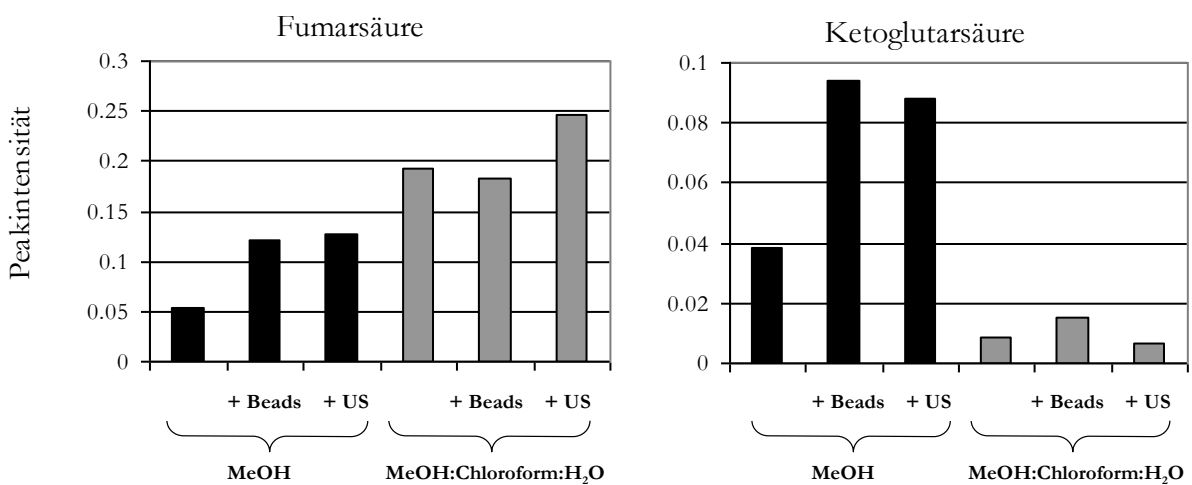
Mammalische Zellen wachsen in einem komplexen Kulturmedium, das vor der Extraktion von den Zellen separiert werden muss. Das Kulturmedium ist reich an Aminosäuren und Vitaminen, Moleküle, die teilweise von den Zellen selbst synthetisiert werden. Wenn Zellen außerdem über einen längeren Zeitraum stimuliert werden, wie die chronische Stimulation von INS-1 mit Glukose, ist die Anwendung von Serum, welches von unbekannter Zusammensetzung ist, essentiell, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten. Des Weiteren scheiden Zellen eine Vielzahl an Molekülen bekannter und unbekannter Natur aus. Um sicher zu gehen, dass ausschließlich intrazelluläre Metaboliten nach Extraktion gemessen werden, wurde anfänglich überprüft, wie viele Waschschrte maximal notwendig sind, um die Zellen einerseits ausreichend vom Mediumüberstand zu befreien und andererseits einem möglichst geringen metabolischen Stress auszusetzen. Dazu wurde das Medium mit Acetylsalicylsäure oder Coffein versetzt, Metaboliten, von denen angenommen wurde, dass diese sich weder im originären Kultivierungsmedium befinden, noch von den Zellen synthetisiert werden. Dann wurde jeder Waschüberstand mittels GC-tofMS analysiert und anhand der Abnahme von Acetylsalicylsäure und Coffein war zu beobachten, dass zweimaliges Waschen mit 0,9%ger NaCl ausreichend war, um Mediumrückstände zu entfernen (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Nach zweimaligem Waschen der INS-1 sind keine Rückstände von Acetylsalicylsäure und Coffein mehr im Medium zu detektieren. M = Mediumüberstand nach Zugabe von Acetylsalicylsäure oder Coffein, W = Waschüberstand

### *Auswahl des Extraktionslösungsmittels*

Eine weitere Problematik ist die chemische Vielfalt der Metaboliten [77]. Hydrophobe Verbindungen, dazu gehören Lipide, lassen sich bevorzugt mit organischen Lösungsmitteln, wie Chloroform, Ether, Benzol oder Kohlenwasserstoffen extrahieren. Hydrophile Verbindungen, wie Zuckermoleküle sind dagegen wasserlöslich und lassen sich gut in Methanol extrahieren, welches im Lösungsvermögen dem Wasser sehr ähnelt. Daher wurde überprüft, ob sich Methanol oder ein Gemisch aus Methanol/Chloroform/Wasser am besten zur Extraktion eignen.

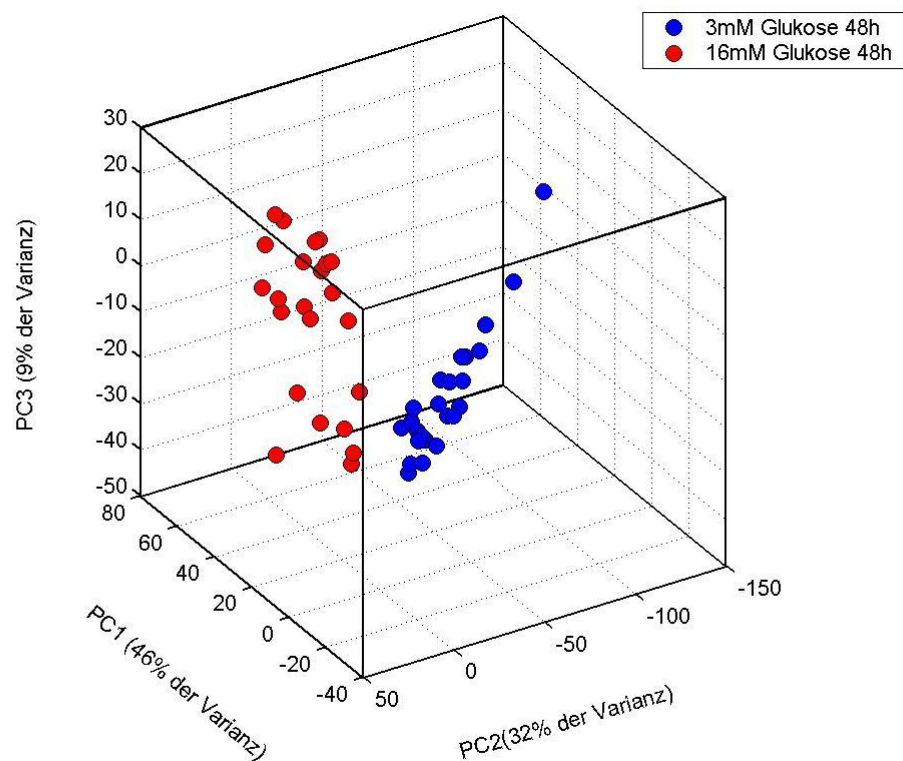


**Abbildung 8:** Einfluss der eingesetzten Lösungsmittel auf die Extrahierbarkeit von intrazellulären Metaboliten. Beads = Glaskügelchen Ø 1 mm, US = Ultraschall

Die Zellpellets wurden außerdem einer zusätzlichen Ultraschallbehandlung unterzogen oder mit Glaskügelchen mechanisch zerkleinert. Am Beispiel von zwei Metaboliten ähnlicher Struktur ist die Effizienz der jeweiligen Extraktionsmethode dargestellt (Abbildung 8). Es ist ersichtlich, dass mit Methanol/Chloroform/Wasser eine Extraktion von Fumarsäure am besten gelang.  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure ließ sich am besten mit Methanol extrahieren. Ein mechanischer Zellaufschluss oder Sonifizieren verbesserte das Ergebnis. Fumarsäure und  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure sind beides mitochondriale Dicarbonsäuren und trotzdem ist deren Extrahierbarkeit stark vom jeweiligen Lösungsmittel abhängig. Bei anderen Metabolitenklassen ist die Effizienz der Extrahierbarkeit ebenfalls vom Lösungsmittel abhängig. Ein optimaler Lösungsmittelmix, der eine vergleichbar gute Extrahierung der unterschiedlichen Molekülklassen gewährleistet ist bisher nicht verfügbar. Für relative Untersuchungen ist die Effizienz allerdings weniger von Bedeutung. Da die Mehrzahl an Metaboliten besser mit Chloroform/Methanol/Wasser und zusätzlicher Ultraschallbehandlung extrahierbar war, wurde dieses Protokoll künftig für weitere Untersuchungen verwendet.

### **3.1.2 Unterscheidung von INS-1 bei 3 mM und 16 mM Glukose anhand des metabolischen Profils**

Nach der GC-TOF/MS Analyse von INS-1 Proben wurde zunächst eine für INS-1 Zellen spezifische Metabolitenreferenzliste erstellt. Dazu wurden die gemessenen Metaboliten durch einen Vergleich der Massenspektrenähnlichkeit und der Übereinstimmung der Retentionszeit mit authentischen Substanzen der Anwenderbibliothek des Max-Planck Instituts für Molekulare Pflanzenphysiologie identifiziert. Es konnten nach Ausschluss von Kontaminationen 74 zelluläre Metaboliten identifiziert werden, 181 Metaboliten konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Die unüberwachte multivariate Hauptkomponentenanalyse wurde angewandt, um die Unterschiedlichkeit von INS-1 unter chronisch niedrigen und hohen Glukosebedingungen im Hinblick auf deren metabolische Beschaffenheit zu visualisieren. In die Analyse wurden alle identifizierten und nichtidentifizierten Metaboliten (insgesamt 255) eingeschlossen. Der erstellte Score-Plot in Abbildung 9 demonstriert eine klare Differenzierung von INS-1 nach zweitägiger Stimulierung mit 3 mM und 16 mM Glukose.



**Abbildung 9:** Die Hauptkomponentenanalyse visualisiert die Unterschiedlichkeit des Metabolitenprofils von INS-1 stimuliert mit 3 mM (blau, n = 24) und 16 mM Glukose (rot, n = 23) für 48 h. Alle 255 Metaboliten wurden in die Analyse einbezogen. PC1, 2 und 3 = Hauptkomponenten 1, 2 und 3

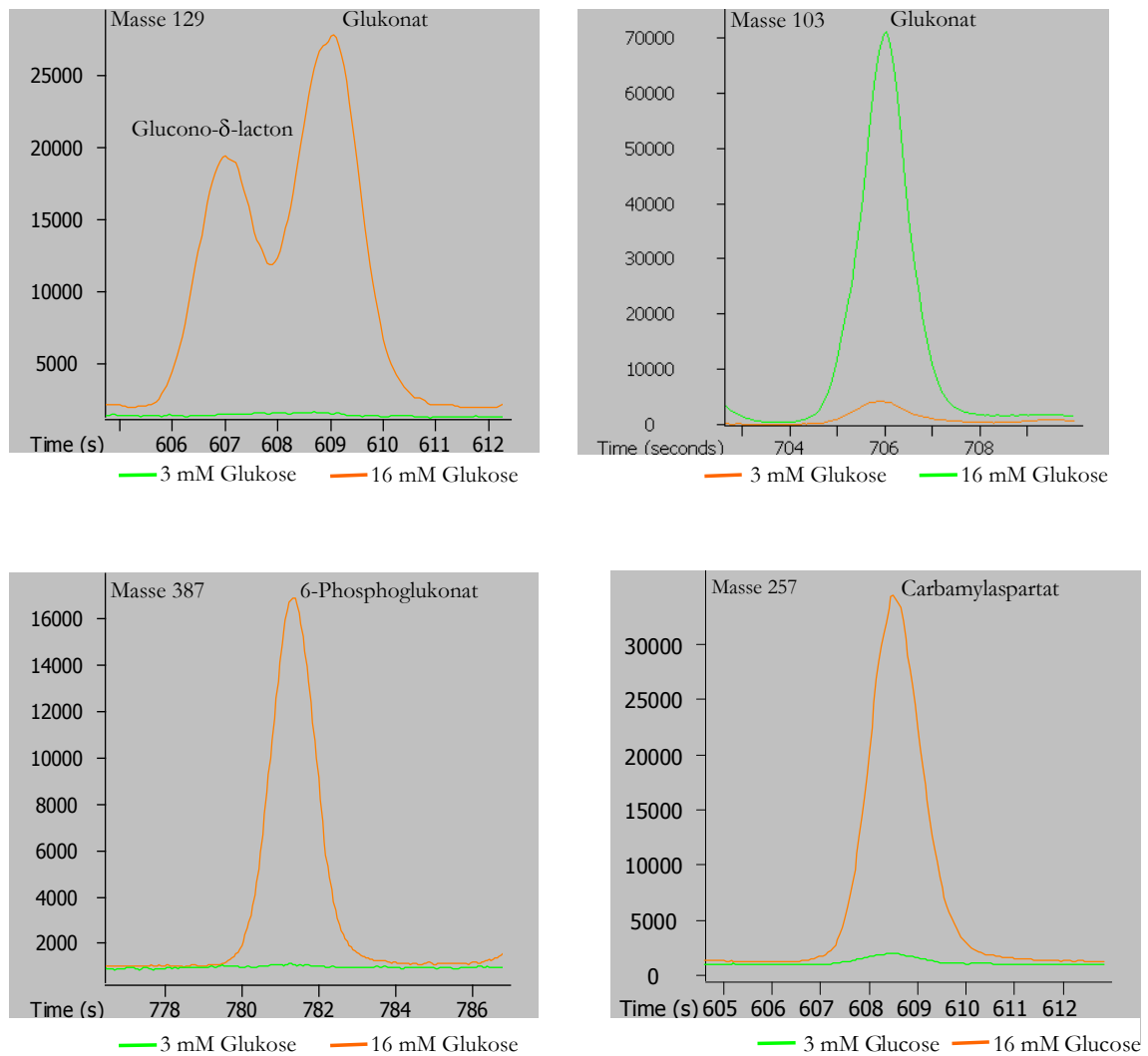
### 3.1.3 Veränderungen im Metabolitenmuster nach chronischer Glukosestimulation

Im Anschluss an die Hauptkomponentenanalyse wurden die Daten im Kontext der Stoffwechselwege betrachtet (biochemische Interpretation der Daten). Eine Liste aller identifizierter und vermeintlich identifizierter (putativ) Metabolite, die in die PCA-Analyse einbezogen wurden, ist in Tabelle 3 dargestellt. Die Metaboliten wurden potentiellen Stoffwechselwegen zugeordnet. Anhand der identifizierten Metaboliten waren die deutlichsten Veränderungen bei Metaboliten aus dem Glukoseabbaustoffwechsel zu beobachten. Zum Beispiel waren die Spiegel der glykolytischen und mitochondrialen Metaboliten erhöht. Besonders stark reicherte sich im Mitochondrium  $\alpha$ -Ketoglutarat (circa 70-fach) an. Auffallend waren außerdem die Metabolite des Pentosephosphatweges Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat. Glucono- $\delta$ -lacton und 6-Phosphoglukonat waren bei 3 mM Glukose überhaupt nicht detektierbar, akkumulierten aber bei 16 mM Glukose. Die Intensität von Glukonat war bei 3 mM sehr niedrig und lag an der unteren Grenze der Empfindlichkeit des

**Tabelle 3:** Dargestellt ist eine Liste aller identifizierten Metaboliten und deren Änderung nach 48 h Inkubation mit 16 mM Glukose versus 3 mM Glukose. Das Vielfache wurde aus dem Median von 25 voneinander unabhängig kultivierten Proben je Kultivierungsbedingung (3 mM beziehungsweise 16 mM Glukose) ermittelt. Der p-Wert wurde mittels nichtparametrischen Mann-Whitney-U Test berechnet. "Erhöht" bedeutet, dass der entsprechende Metabolit bei 3 mM Glukose nicht detektierbar war, aber eine Anreicherung bei 16 mM Glukose zu verzeichnen war. Die Berechnung einer n-fachen Veränderung war aus diesem Grund nicht möglich.

Metabolit	p-Wert	Vielfaches	Metabolit	p-Wert	Vielfaches
Glukose	< 0,00001	+ 5,2	<b>Harnstoffzyklus</b>		
			Urea	n.s.	
<b>Glykolyse</b>					
Glukose-6-Phosphat	< 0,00001	+ 3,5	<b>Aminosäuren</b>		
Glycerat-3-Phosphat	< 0,00001	+ 8,3	Alanin	n.s.	
Phospho(enol)pyruvat	< 0,00001	+ 4,6	Arginin	< 0,01	- 4,8
Pyruvat	< 0,00001	+ 10,1	Asparagin	n.s.	
			Aspartat	< 0,05	+ 1,3
<b>Krebszyklus</b>			Beta-Alanin	n.s.	
Citrat	< 0,00001	+ 3,9	Cystein	n.s.	
$\alpha$ -Ketoglutarat	< 0,00001	+ 69,8	Homocystein	n.s.	
Succinat	< 0,005	+ 3,9	Glutamat	n.s.	
Fumarat	< 0,00001	+ 4,3	Glutamin	n.s.	
Malat	< 0,00001	+ 8,4	Glycin	n.s.	
			Histidin	n.s.	
<b>Glykogensynthese</b>			Homoserine (putativ)	< 0,05	+ 3,5
Glukose 1-Phosphat	< 0,005	+ 1,5	Hydroxyprolin	< 0,005	+ 2,0
			Hypotaurin	n.s.	
<b>Polyolsynthese</b>			Isoleucin	< 0,005	+ 2,4
Sorbitol	< 0,01	+ 2,1	Leucin	< 0,005	+ 2,0
Fruktose	< 0,01	+ 1,6	Homoserin	n.s.	
			Methionin	n.s.	
<b>Pentosephosphateweg</b>			Oxoprolin	n.s.	
Glucono- $\delta$ -lacton	< 0,00001	<i>erhöht</i>	Phenylalanin	< 0,005	+ 2,4
6-Phosphoglukonat	< 0,00001	<i>erhöht</i>	Prolin	< 0,01	+ 1,6
Glukonat	< 0,00001	+ 58	Serin	n.s.	
Ribulose 5-Phosphat	< 0,0001	+ 3,8	Taurin	n.s.	
Ribose 5-Phosphat	< 0,005	+ 1,8	Threonin	n.s.	
			Tyrosin	n.s.	
<b>Inositolbiosyntheseweg</b>			Valin	n.s.	
Myo-Inositol	n.s.				
			<b>Fettsäuren</b>		
<b>Esterifikation</b>			Pantothersäure	n.s.	
Glycerolphosphat	< 0,00001	- 2,7	Lignocerinensäure	n.s.	
Glycerol	< 0,0005	+ 2,1	Palmitinsäure	n.s.	
			Plamitoleinsäure	< 0,0005	+ 1,9
<b>DNA Synthese</b>			Arachidonsäure	< 0,005	- 1,7
Carbamylaspartat	< 0,00001	+ 8,7	Behensäure	n.s.	
Orotat	n.s.		Heptadecansäure (Margarinsäure)	n.s.	
Uridine 5-Monophosphat	n.s.		Pentadecanoic acid	n.s.	
Cytidine 5-Triphosphat (putativ)	n.s.		Myristinsäure	n.s.	
2-Deoxyuridine 5-Triphosphat	n.s.		Stearat	n.s.	
<b>Cholesterolbiosynthese</b>			<b>NAD/NADP Synthese</b>		
Dimethylallylpyrophosphat	n.s.		Nicotinamid	< 0,05	+ 1,7
Cholesterol	n.s.				
			<b>Phospholipidsynthese</b>		
<b>GABA Synthese</b>			Cytidine 5-Diphosphoethanolamin	n.s.	
$\gamma$ -Aminobutyrat	< 0,00001	+ 3,3			
			<b>Vitamine</b>		
<b>Polyaminsynthese</b>			Riboflavin (putativ)	n.s.	
Ornithin	< 0,00001	- 5,0			
Putrescin	< 0,00001	+ 6,3	<b>Sonstige</b>		
Spermidin	n.s.		Benzoesäure	n.s.	
			Aminomalonsäure	< 0,00001	+ 4,3

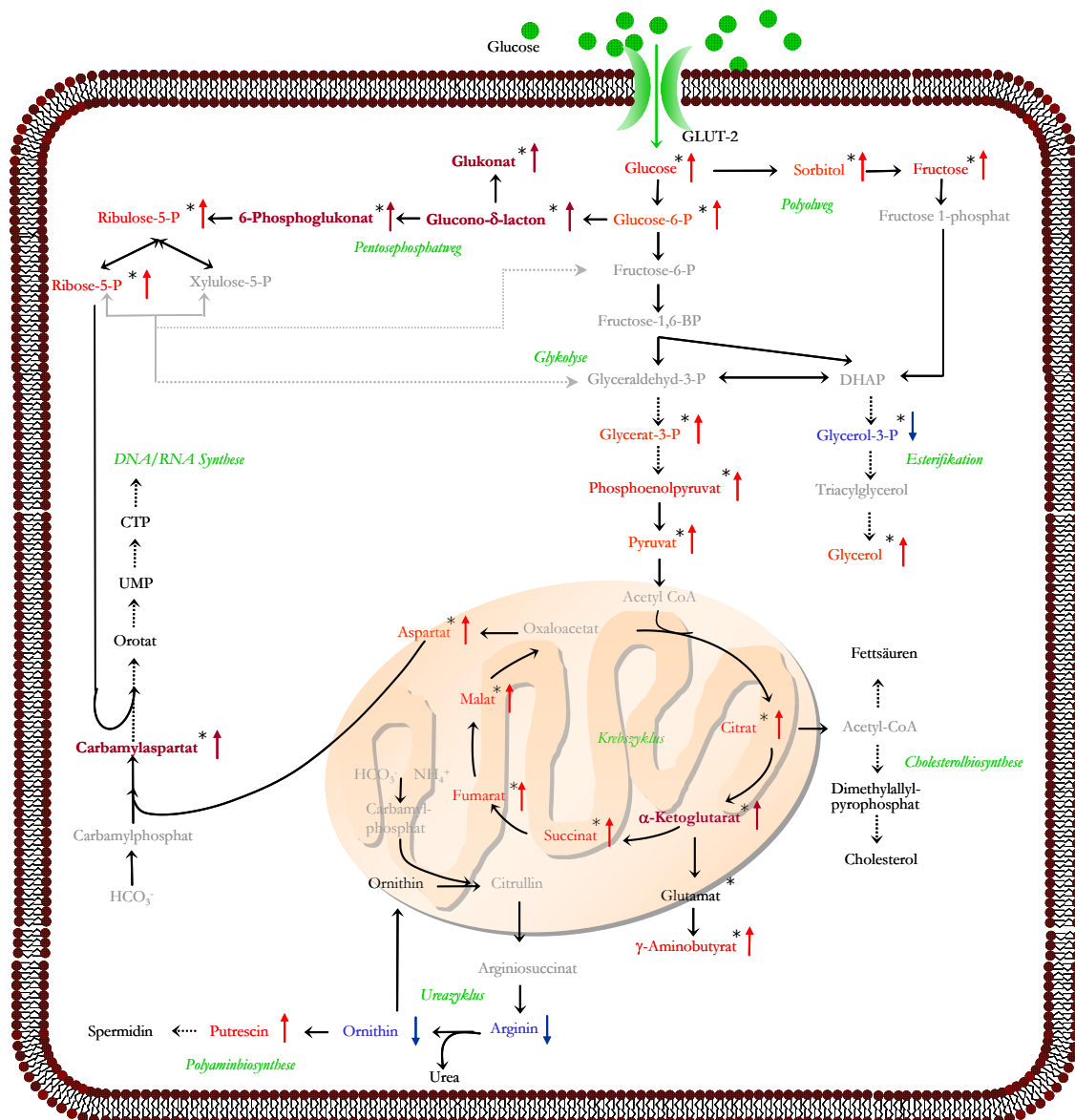
benutzten Nachweisverfahrens. Die Glukonsäure ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, da es sich nach unserem Wissen um ein neu identifiziertes Stoffwechselprodukt in pankreatischen  $\beta$ -Zellen handelt. Auch Carbamylaspartat, initialer Metabolit der RNA/DNA Synthese, die sich an den Pentosephosphatweg anschließt, akkumulierte bei 16 mM Glukose, während es nur in sehr geringen Mengen bei 3 mM Glukose vorhanden war. Um dies bildlich zu veranschaulichen sind in Abbildung 11 die Massenintensitäten chromatographisch dargestellt.



**Abbildung 11:** Massenintensitäten von Glucono- $\delta$ -lacton (Masse 129), 6-Phosphoglukonat (Masse 387) und Glukonat (Masse 103) und Carbamylaspartat (Masse 257) nach 48 h Stimulation mit 3 mM und 16 mM Glukose. Glukonat wurde anhand der Masse 103 quantifiziert, um es besser von Glucono- $\delta$ -lacton zu unterscheiden.

Von den identifizierten Aminosäuren waren nur wenige verändert. Darunter befanden sich sowohl essentielle, nicht von der Zelle synthetisierbare Aminosäuren, wie Leucin, Isoleucin und Phenylalanin, als auch von der Zelle synthetisierbare Aminosäuren, wie z.B. Aspartat, welches im Zitronensäurezyklus aus Oxaloacetat gebildet wird und Arginin, welches aus Arginiosuccinat im

Harnstoffzyklus synthetisiert werden kann. Nur 2 der detektierbaren Fettsäuren waren geringfügig (< 2-fach) verändert. Dabei handelt es sich um Palmitoysäure und Arachidonsäure. Insgesamt betrachtet war zellulär ein starker Anstieg organischer Säuren auffallend. Um einen besseren Überblick über das Stoffwechselprofil bei chronisch hohen Glukosekonzentrationen in INS-1 Zellen zu erhalten, wurden die Stoffwechselwege miteinander verbunden und als Stoffwechselschema in Abbildung 10 dargestellt. Um sicher zu gehen, dass es sich bei einer Vielzahl der detektierten Metaboliten tatsächlich um Glukoseabbauprodukte handelte, wurde [ $^{12}\text{C}$ ]Glukose durch [ $^{13}\text{C}$ ]Glukose ersetzt. Auf den methodischen Nachweis wird unter 3.1.6 „Untersuchungen mit [ $^{13}\text{C}$ ]Glukose“ näher eingegangen.

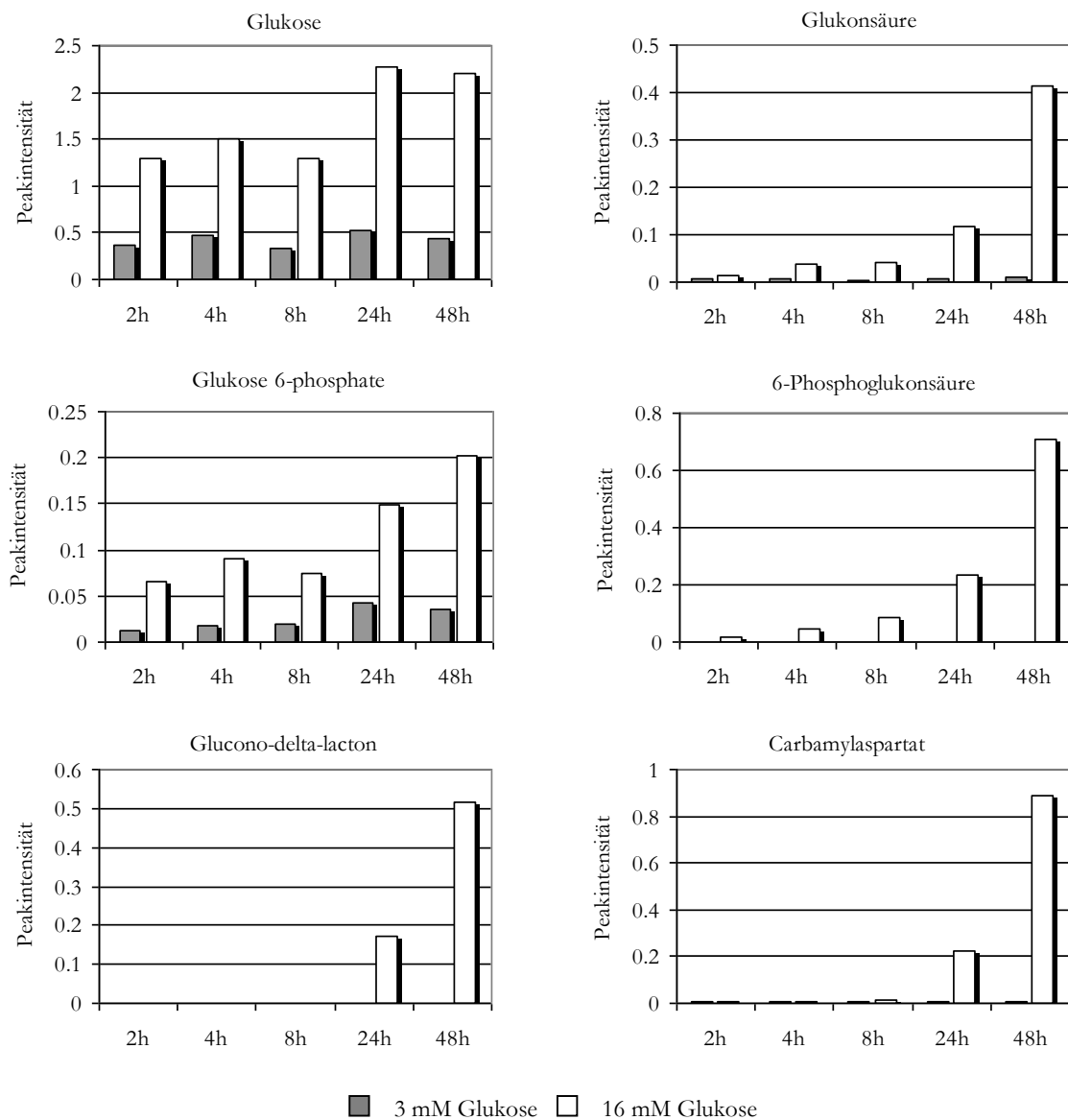


**Abbildung 10:** Hyperglykämie-induzierte Veränderungen von identifizierten Metaboliten sind in potentiellen Signalwegen von INS-1 unter chronisch hohen Glukosebedingungen dargestellt. Metaboliten, dargestellt in rot waren signifikant erhöht, in weinrot stark akkumuliert, in blau signifikant vermindert, in schwarz unverändert und jene in grau nicht detektierbar. Gestrichelte Pfeile weisen auf weitere Intermediärmetaboliten hin, die aufgrund der Übersichtlichkeit nicht dargestellt wurden. Die Metaboliten mit Asterisk \* konnten mit [ $^{13}\text{C}$ ]Glukose bestätigt werden.



### 3.1.4 Zeitpunktabhängige Veränderungen von Metaboliten nach Glukosestimulation

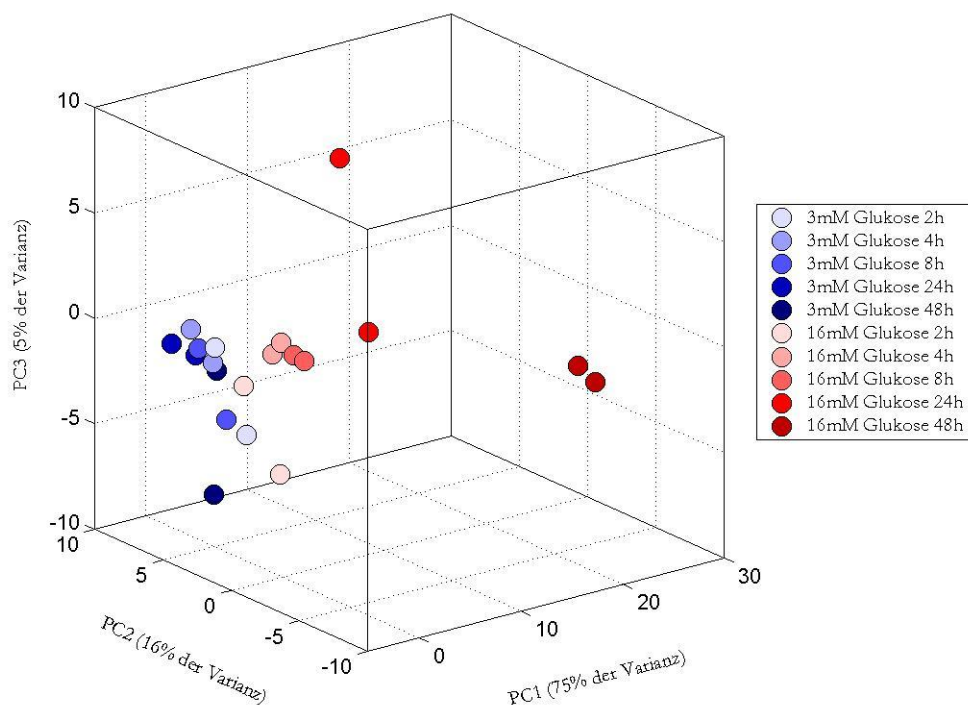
Eine erneute Analyse der Metaboliten zu den in Abbildung 12 dargestellten Zeitpunkten zeigte bereits eine erhöhte zelluläre Konzentration von Glukose und Glukose-6-Phosphat 2 h nach extrazellulärer Gabe von 16 mM Glukose im Vergleich zu 3 mM Glukose. Dies traf auch für die glykolytischen und mitochondrialen Metaboliten zu, die im Anschluss an die Glukosephosphorylierung entstehen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 12:** Analyse von zellulärer Glukose, Glukose-6-Phosphat, den Pentosephosphatwegmetaboliten Gluono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat, Glukonat und Carbamylaspartat der Pyrimidinsynthese zu den auf der x-Achse dargestellten Zeitpunkten.

Dagegen war eine deutliche Anreicherung der Pentosephosphatwegmetaboliten Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat und von Carbamylaspartat der Pyrimidinsynthese erst 24 h nach Inkubation mit 16 mM Glukose erkennbar, deren Spiegel innerhalb von 48 h weiter anstiegen. Eine Anreicherung der Pentosephosphatwegmetaboliten und von Carbamylaspartat war damit nur unter chronischen hohen Glukosebedingungen zu verzeichnen, während die Spiegel bei chronisch niedriger Glukose nicht detektierbar waren beziehungsweise sich an der untersten Grenze der Detektionsgrenze befanden. Nach 48 h mit 16 mM Glukose war ebenfalls eine Anreicherung von zellulärer Glukose und Glukose-6-Phosphat in INS-1 bei erkennbar. Es ist zu vermuten, dass eine Anstauung der Pentosephosphatwegmetaboliten zu einem Rückstau und dadurch ebenfalls zu einer Anreicherung von Glukose-6-Phosphat und Glukose führte.

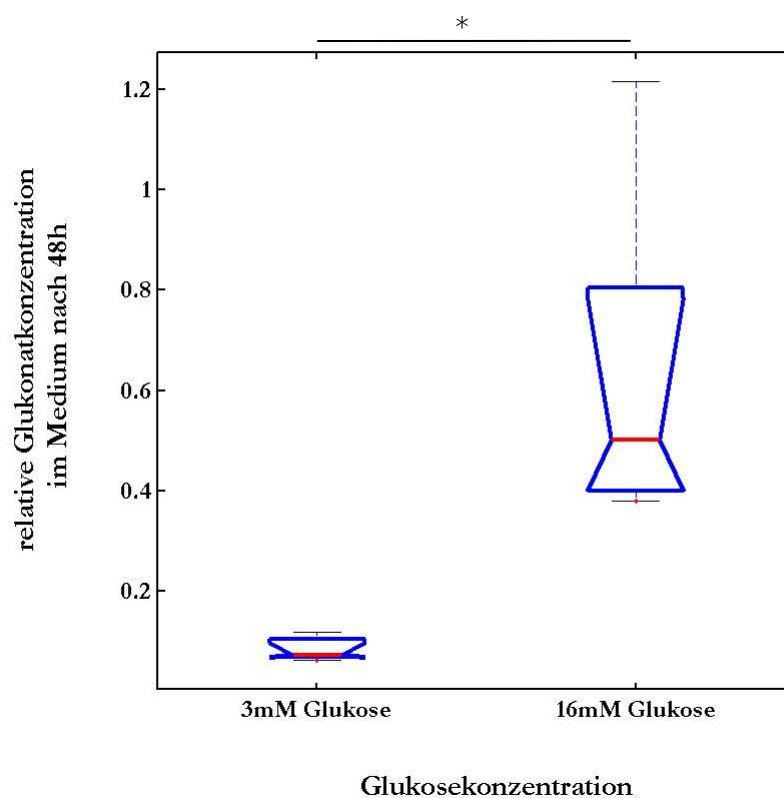
Eine Visualisierung der Metabolitenprofile zu den untersuchten Zeitpunkten zeigt, dass nach kurzzeitiger Stimulation (2 h) mit 3 mM beziehungsweise 16 mM Glukose noch keine klare Unterscheidung der Profile mittels Hauptkomponentenanalyse möglich war (Abbildung 13). Eine Zunahme der Inkubationsdauer separierte INS-1 kultiviert mit 16 mM Glukose immer mehr von INS-1 kultiviert bei 3 mM Glukose. Die Zellen kultiviert bei 16 mM Glukose für 24 h und 48 h trennten sich deutlich von den Zellen kultiviert bei 3 mM Glukose und denen kurzzeitig kultiviert bei 16 mM Glukose. Die Profile von INS-1 kurzzeitig und chronisch kultiviert bei 3 mM Glukose ließen dagegen keine Differenzierung zu.



**Abbildung 13:** Repräsentativer Scoreplot nach Hauptkomponentenanalyse von INS-1 Metaboliten (Proben im Duplikat), welche zu den in der Legende gekennzeichneten Zeitpunkten untersucht wurden. Alle 74 identifizierten Metaboliten wurden in die Analyse einbezogen.

### 3.1.5 Erhöhte Mengen von Glukonat im Medium von INS-1 Zellen bei 16 mM Glukose

Da es sich bei der in INS-1 Zellen neu identifizierten Glukonsäure um eine Monocarboxylsäure handelt, wurde angenommen, dass diese bei zellulärer Anhäufung eventuell ins Medium ausgeschieden wird. Die Glukonsäure ähnelt in ihrer Struktur dem Laktat, welches bei Überschuss über Monocarboxylsäuretransporter, zum Beispiel von Muskelzellen ausgeschieden wird. Tatsächlich war Glukonat auch nach 48 h Inkubation mit 16 mM Glukose in signifikant erhöhten Mengen im Mediumüberstand präsent (Abbildung 14).

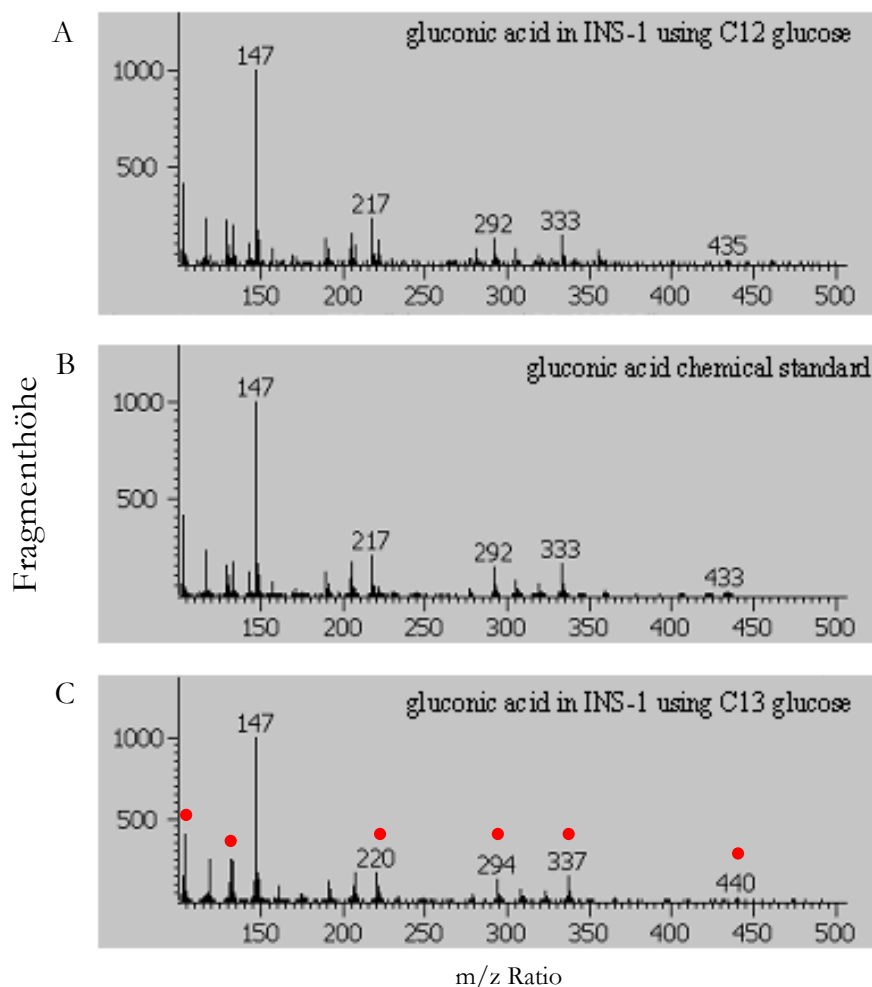


**Abbildung 14:** Box-Plot zur Darstellung der relativen Glukonatkonzentration im Medienüberstand von INS-1 nach 48 h Stimulation mit 3 mM (n = 5) und 16 mM Glukose (n = 5). "•" Maximalbeziehungsweise Minimalwert, "-" Median, " " Intervall zwischen dem 25%- und dem 75%-Quantil. \* = p < 0,05

### 3.1.6 Untersuchungen mit [<sup>13</sup>C]Glukose

Die [<sup>13</sup>C]-isotopenmarkierte Glukose wird während des Katabolismus in die entstehenden Metabolite eingebaut, womit deren Synthese nachverfolgt werden kann. Das liefert zum einen Hinweise darauf in welche Stoffwechselwege Glukose eingeht, zum anderen bekräftigt es die

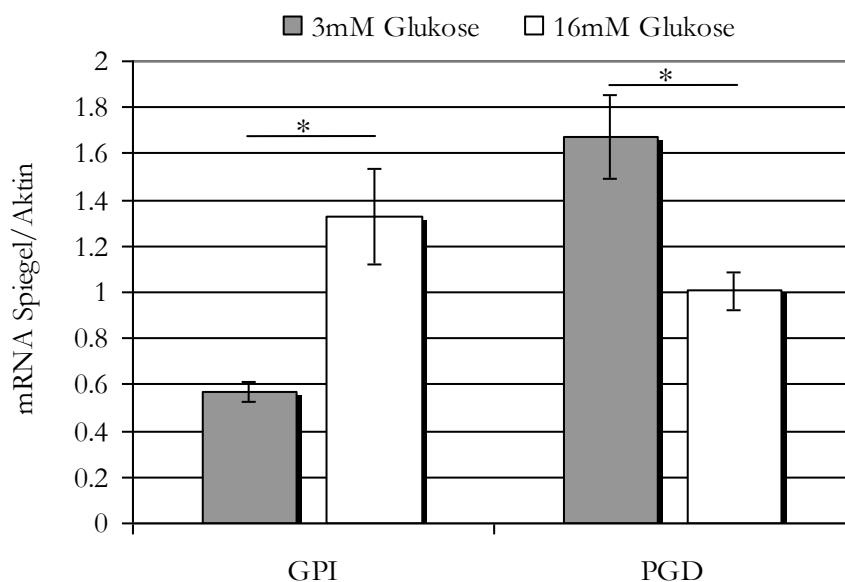
Tatsache, dass es sich bei der Identifizierung der Metaboliten um intrazellulär gebildete Stoffwechselabbauprodukte handelt. Letztlich dient es auch dem Nachweis, dass es sich bei neu identifizierten Metaboliten, in diesem Falle bei Glukonat, tatsächlich um Produkte aus dem Glukosestoffwechsel handelt. Am Beispiel von Glukonsäure wird dies in Abbildung 15 veranschaulicht. Im Massenspektrum B ist die kommerziell erhältliche Glukonsäure als Referenzsubstanz dargestellt, welche als Vergleich für die Identifizierung des Metaboliten in INS-1 diene (Spektrum A). Im Spektrum C sind Verschiebungen der Massenintensitäten nach Anwendung von  $^{13}\text{C}$ Glukose zu erkennen, was den Abbau von Glukose zu Glukonsäure bewies. Alle weiteren Metaboliten, welche mit  $^{13}\text{C}$ Glukose verfolgt werden konnten, sind in Abbildung 11 mit einem Asterisk \* gekennzeichnet.



**Abbildung 15:** Massenspektren von Glukonsäure aus INS-1 Extrakten mit  $^{12}\text{C}$ Glukose (A), als Referenzsubstanz (B), aus INS-1 Extrakten mit  $^{13}\text{C}$ Glukose (C). Die Massenintensitäten, gekennzeichnet mit einem roten Punkt sind mit  $^{13}\text{C}$ Glukose nach rechts verschoben.

### 3.1.7 Expressionsanalysen von Glukosephosphatisomerase und 6-Phosphoglukonatdehydrogenase

Verschiedenen Berichten zufolge haben Studien über die Beziehungen zwischen dem Pentosephosphatweg und dem Kohlenhydratstoffwechsel in der Glykolyse ergeben, dass das Intermediärprodukt des Pentosephosphatweges, 6-Phosphoglukonat die Aktivität der Glukosephosphatisomerase (GPI) im Gehirn hemmen kann [78, 79]. Allerdings scheint diese Hemmung der Glykolyse zelltypspezifisch zu sein und kann nicht auf alle Zelltypen übertragen werden [80]. Obwohl in INS-1 Zellen aufgrund erhöhter Mengen glykolytischer und mitochondrialer Metaboliten nach 48 h Hyperglykämie eine Hemmung der Glykolyse ausgeschlossen werden kann, wurden die mRNA-Spiegel der GPI überprüft. Da außerdem die Spiegel von Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat bei 16 mM Glukose intrazellulär stark erhöht waren und das Produkt der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase (PGD) Ribulose-5-Phosphat nur minimal erhöht war, kann eine verminderte Aktivität der PGD zumindest diskutiert werden. In Abbildung 16 ist ersichtlich, dass die GPI mRNA Spiegel erhöht und die PGD mRNA Spiegel erniedrigt waren.



**Abbildung 16:** Relative mRNA Spiegel von Glukosephosphatisomerase (GPI) und 6-Phosphoglukonatdehydrogenase (PGD) in INS-1 kultiviert bei 3 mM und 16 mM Glukose für 48 h. \* =  $p < 0,05$

Um sichere Aussagen treffen zu können, wären Proteinaktivitätsuntersuchungen erforderlich. Da für Rattenzelllinien momentan keine kommerziell erhältlichen Antikörper für diese Enzyme zur

Verfügung stehen, war eine Untersuchung dieser Proteine im Rahmen dieser Arbeit nicht realisierbar. Man kann anhand der Metabolitenmessungen und der mRNA Spiegel von GPI und PGD jedoch spekulieren, dass die Glykolyse bei chronisch hohen Glukosekonzentrationen nicht beeinträchtigt ist, die PGD im Pentosephosphatweg dagegen aber ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym sein könnte.

### **3.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse aus den in Kapitel 3.1 dargestellten Untersuchungen zeigten, dass

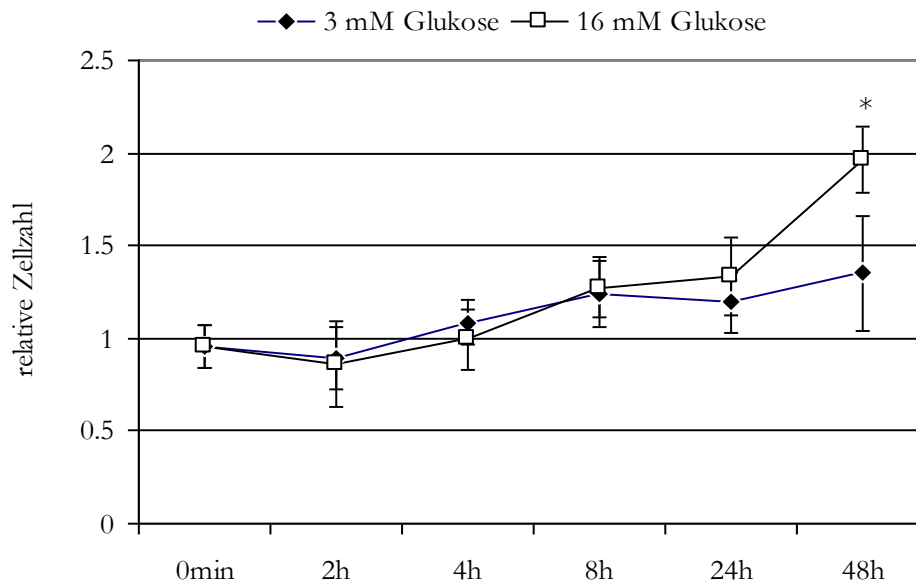
1. sich INS-1 für 48 h kultiviert bei 3 mM und 16 mM Glukose anhand ihres metabolischen Profils unterschieden.
2. es zu einer Anreicherung einer Vielzahl von Metaboliten in unterschiedlichsten Stoffwechselwegen kam und dies eine Anstauung einzelner Metaboliten zur Folge hatte.
3. die Metaboliten Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat des Pentosephosphatweges, sowie Carbamylaspartat der Pyrimidinsynthese und das mitochondriale  $\alpha$ -Ketoglutarat unter chronisch hohen Glukosekonzentrationen zellulär möglicherweise „kritisch“ akkumulieren.

## **3.2 Charakterisierung von INS-1 unter chronisch hoher Glukosekonzentration**

Dass chronisch erhöhte Glukosekonzentrationen die  $\beta$ -Zellfunktion beeinträchtigen, konnte wie unter 1.3.1 „Glukosetoxizität“ beschrieben, sowohl in verschiedenen  $\beta$ -Zelllinien, als auch in isolierten Inseln gezeigt werden. Um die glukosevermittelte Regulation der Insulingenexpression genauer darzustellen, wurden zum einen die Expression diverser Transkriptionsfaktoren und zum anderen die Beteiligung bestimmter Proteinsignalwege untersucht.

### **3.2.1 Glukose steigert die Zellproliferation**

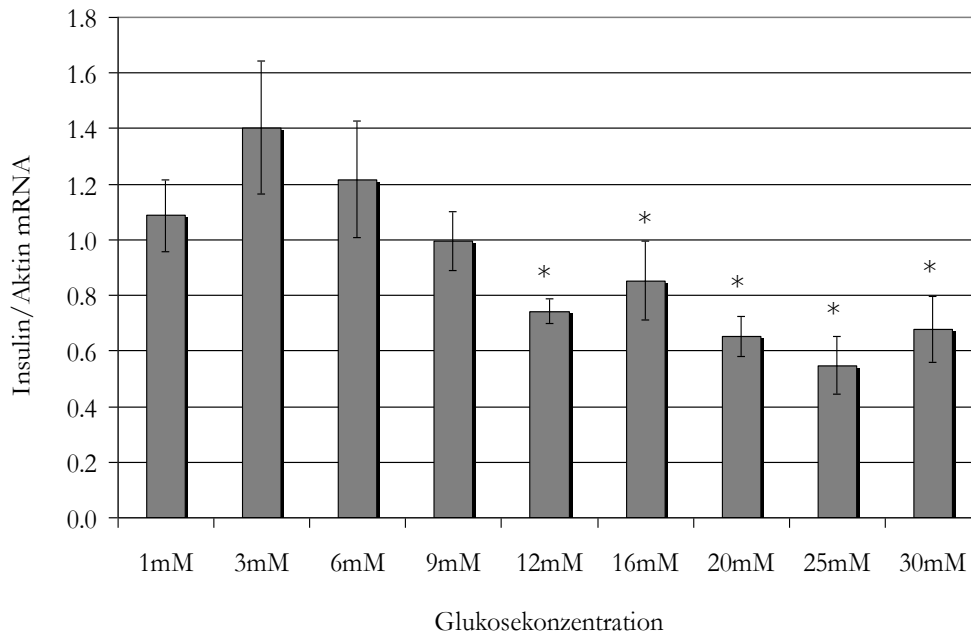
Mikroskopisch ließ eine Stimulation von INS-1 Zellen mit erhöhten Glukosekonzentrationen eine Zunahme der Zellzahl vermuten. Eine Zellzahlbestimmung bestätigte die Vermutung, dass die INS-1 Zellen bei 16 mM Glukose stärker als bei 3 mM proliferieren (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Proliferationsverhalten von INS-1 kultiviert bei 3 mM beziehungsweise 16 mM Glukose über einen Zeitraum von 48 h. \*  $p < 0,05$  versus 3 mM Glukose zum Zeitpunkt 48 h.

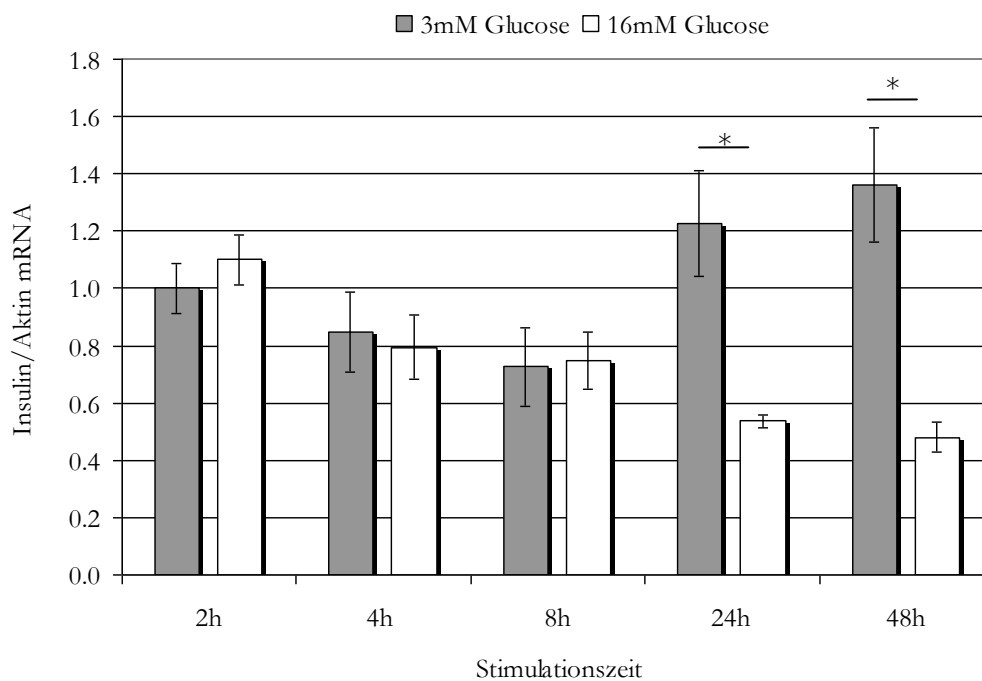
### 3.2.2 Chronisch hohe Glukosekonzentrationen mindern die Insulin mRNA

Nach 2-tägiger Inkubation der INS-1 Zellen mit verschiedenen Glukosekonzentrationen, war mit Zunahme der Glukosekonzentration eine Abnahme der Insulin-mRNA zu beobachten, wobei ab einer Konzentration von 12 mM Glukose die Insulin-mRNA Spiegel gleich niedrig verblieben. Bei 3 mM Glukose waren die Insulin-mRNA Spiegel am höchsten (Abbildung 18). Um sichere Aussagen zu treffen wurden alle weiteren Experimente mit 16 mM Glukose durchgeführt, da leichte Anstiege in der Zellzahl, eine schnellere Verstoffwechslung der sich im Medium enthaltenden Glukose zur Folge haben können. Bei Absinken der Konzentration unter 12 mM stieg die Insulin-mRNA wieder an und der zu untersuchende Effekt könnte verloren gehen.



**Abbildung 18:** Dosisabhängige (1 – 30 mM Glukose) Regulation der Insulingenexpression in INS-1 nach 48 h Stimulation. Dargestellt ist der MW + SAM von zwei experimentellen Replika mit  $n = 6$  pro Stimulationsbedingung. \* =  $p < 0,05$  versus 3 mM Glukose

Betrachtet man sich die Insulingenexpression zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Abbildung 19), war bei basalen Glukosespiegeln ein leichter Abfall der mRNA innerhalb von 8 h zu beobachten.

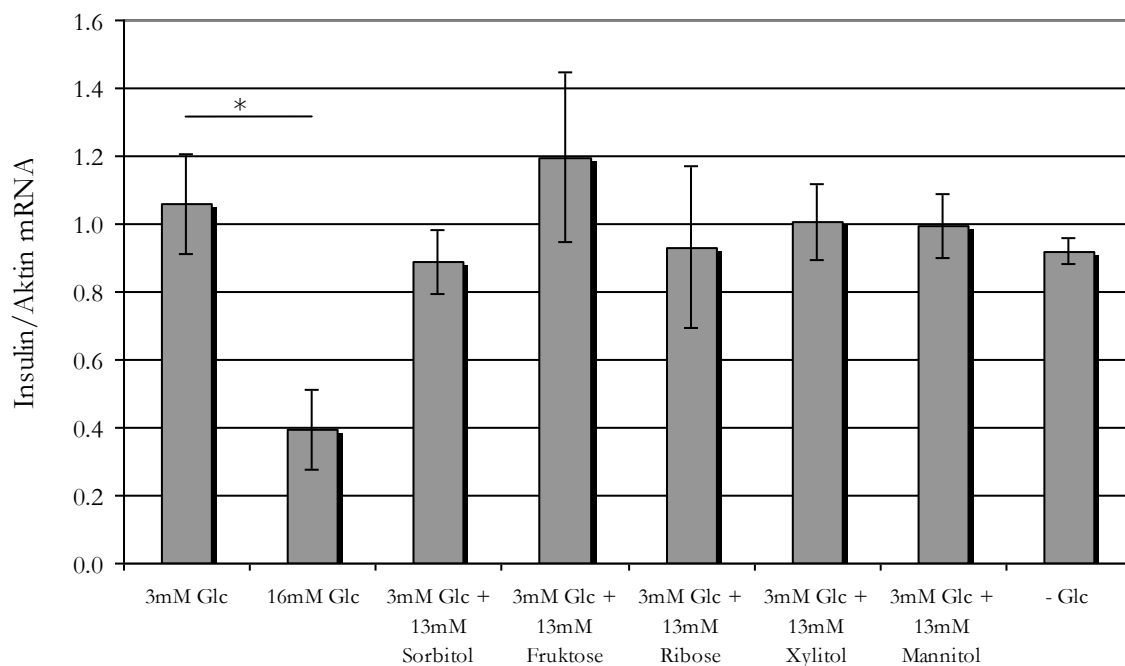


**Abbildung 19:** Zeitabhängige (0, 2, 4, 8, 24, 48 h) Regulation der Insulingenexpression in INS-1 kultiviert bei 3 mM beziehungsweise 16 mM Glukose. Dargestellt ist der MW + SAM von drei experimentellen Replika mit  $n = 3$  pro Stimulationsbedingung. \* =  $p < 0,001$



Interessanterweise stieg die mRNA dann nach 48 h sogar über den Ausgangswert wieder an. Bei 16 mM Glukose sanken die mRNA Spiegel nach 4 h ab und verblieben auch noch nach 2 Tagen niedrig. Nach 24 h Glukoseinkubation waren die mRNA Spiegel von Insulin bei 16 mM Glukose im Vergleich zu 3 mM Glukose signifikant vermindert.

Eine Verminderung der Insulingenexpression war allerdings nur bei Anwendung von Glukose zu beobachten. Ersetzte man Glukose durch Zucker oder Zuckeralkohole ähnlicher Struktur, welche ebenfalls von den Zellen aufgenommen werden, war dieses Phänomen nicht zu beobachten. In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass weder die verstoffwechselbaren Zucker beziehungsweise Zuckeralkohole Sorbitol, Fruktose, Ribose und Xylitol, noch das nicht verstoffwechselbare Mannitol eine Verminderung der Insulingenexpression zur Folge hatten. Sogar ein 2-tätiger Hungerzustand führte zu keiner signifikanten Minderung der Insulin mRNA Spiegel.

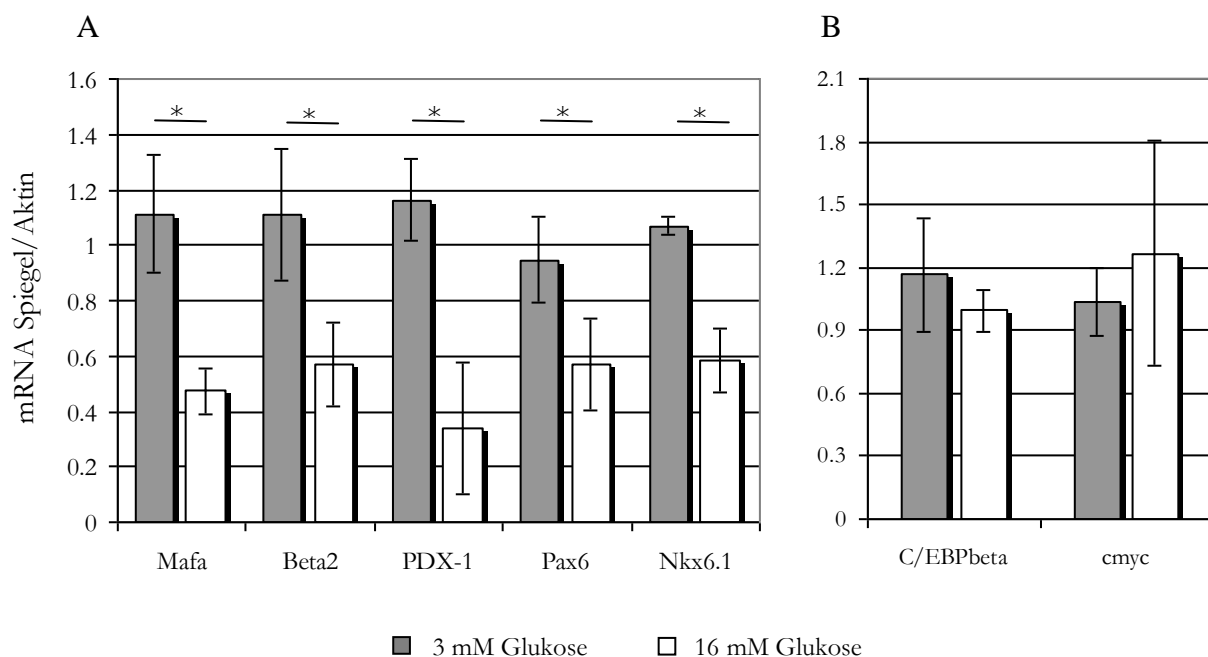


**Abbildung 20:** Insulingenexpression war nicht vermindert, wenn man 13 mM Glukose durch 13 mM Sorbitol, Fruktose, Ribose, Xylitol und Mannitol ersetzte oder wenn man die INS-1 Zellen durch vollständigen Glukoseentzug (- Glc) 48 h hungern ließ. Dargestellt sind die MW + SAM eines repräsentativen Experiments mit  $n = 3$  pro Stimulationsbedingung. Glc = Glukose. \* =  $p < 0,01$

### 3.2.3 Chronisch hohe Glukosekonzentrationen regulieren die mRNA von Schlüsseltranskriptionsfaktoren

#### *Verminderte Expression der Transkriptionsfaktoren PDX-1, MafA, $\beta$ 2, Pax6 und Nkx6.1*

Die Transkriptionsfaktoren MafA,  $\beta$ 2 und PDX-1 wurden untersucht, da diese Proteine die Insulingenexpression synergistisch zu regulieren scheinen [81]. Da die INS-1 Zellen unter hyperglykämischen Bedingungen verstärkt proliferierten, war außerdem die Untersuchung der Homeoboxgene, Pax6 und Nkx6.1 von Bedeutung. Sie induzieren entscheidende Prozesse zur Differenzierung der  $\beta$ -Zelle [82, 83]. In Abbildung 21A sind die mRNA-Expressionsanalysen der Transkriptionsfaktoren MafA,  $\beta$ 2, PDX-1, PAX6, und Nkx6.1 in INS-1 Zellen unter dem Einfluss von basaler und chronisch erhöhter Glukosekonzentration dargestellt. Im Vergleich zu mit 3 mM Glukose behandelten Zellen zeigte sich nach 48 h eine signifikante Abnahme der Genexpression der Insulingenregulatoren PDX-1, MafA und  $\beta$ 2 und der Differenzierungsmarker PAX6 und Nkx6.1 bei Zellen behnadelt mit 16 mM Glukose.



**Abbildung 21:** Regulation von Transkriptionsfaktoren bei chronisch hoher Glukose. Relative mRNA-Expression der Insulingeninitiatoren MafA,  $\beta$ 2 und PDX-1, der Differenzierungsmarker Pax6 und Nkx6.1 (A) und der putativen Insulingenrepressoren C/EBP $\beta$  und cmc (B) in INS-1 Zellen kultiviert in 3 mM beziehungsweise 16 mM Glukose für 48 h. \*  $p < 0,01$

#### *Unveränderte Genexpression der putativen Insulingenrepressoren C/EBP $\beta$ und Cmyc*

Obwohl C/EBP $\beta$  als Repressor der Insulingenexpression identifiziert wurde [36], konnte auf mRNA Ebene keine Zunahme bei 16 mM Glukose gemessen werden. Cmyc wurde auch im

Zusammenhang mit einer verminderten Insulingenexpression untersucht [39], aber auch die Genexpression dieses Transkriptionsfaktors blieb unverändert (Abbildung 21B). Möglicherweise üben diese Faktoren ihren Einfluss auf Proteinebene aus.

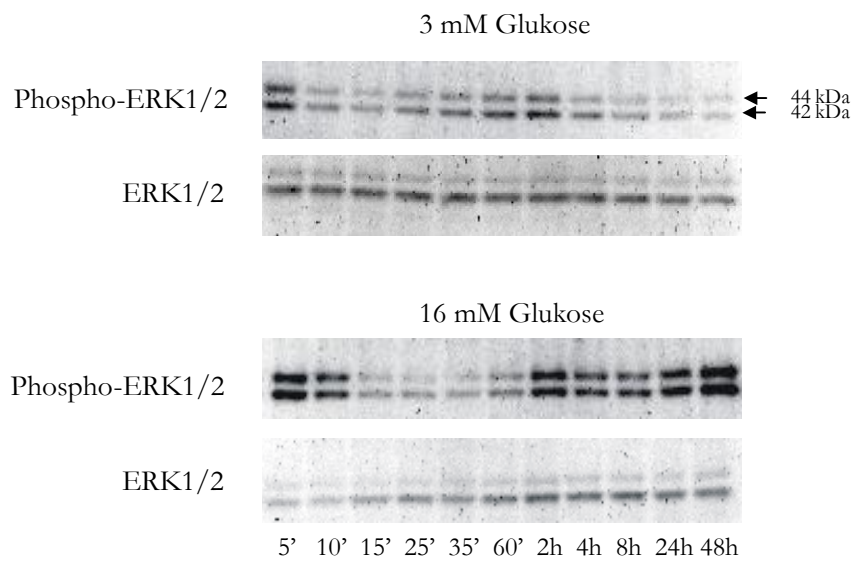
### **3.2.4 Untersuchungen zur Beteiligung von MAPK an der Verminderung der Insulingenexpression**

#### **3.2.4.1 Proteinaktivitätsuntersuchungen**

Da nach chronisch hoher Glukoseexposition die INS-1 Zellen zellulärem Stress ausgesetzt sein könnten, führte dies zu der Vermutung, dass die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) bei der Regulation des Insulingens und der untersuchten Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle spielen könnten. Durch sequenzielle Phosphorylierung geben MAPK Signale zur Transkription einer großen Anzahl von Genen, die für die Regulation entscheidender zellulärer Funktionen wesentlich sind, in den Zellkern weiter. Spezifische Transkriptionsfaktoren werden meistens durch Proteinkinasen aktiviert. Die mögliche Aktivierung und daraus folgende Funktionsänderung der untersuchten Transkriptionsfaktoren durch MAPK wäre das Ende einer langen Signalübermittlungskette, die durch ein Stresssignal ausgelöst werden könnte. Mit kompetitiven und irreversiblen Inhibitoren können diese Enzyme selektiv gehemmt werden. Die MAPK ERK1/2 ist für die Induktion von zellulärer Proliferation von großer Bedeutung und an Differenzierungsprozessen beteiligt, während die MAPK p38 z.B. bei osmotischen Veränderungen aktiviert wird und die durch zellulären Stress aktivierte JNK das Zellwachstum hemmt und die Induktion von Apoptose anstößt. Zu Beginn wurde untersucht, ob Hyperglykämie eine Aktivierung der jeweiligen MAPK zur Folge hat. Dazu wurden die INS-1 bei 3 mM und 16 mM kultiviert und die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, p38 und JNK über einen Zeitraum von 48 h zu den in Abbildung 22, Abbildung 23 und Abbildung 24 angegebenen Zeitpunkten untersucht.

#### ***Aktivitätsuntersuchungen der MAPK ERK1/2 nach Glukoseexposition***

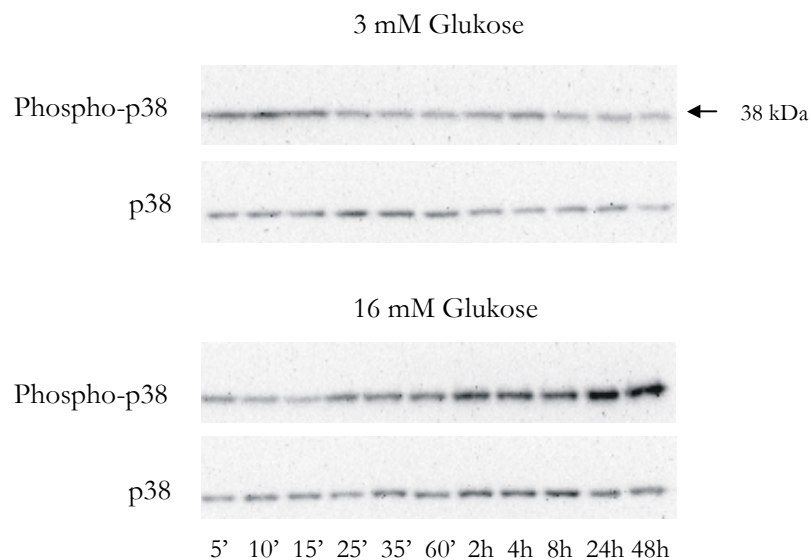
Die Stimulation mit Glukose zeigte anhand der Zunahme der Phosphorylierung eine Aktivierung von ERK1/2 innerhalb von 5 min unabhängig von der Glukosekonzentration, obwohl die Aktivierung bei 16 mM deutlich stärker ausgeprägt war als bei 3 mM Glukose. Im weiteren Zeitverlauf nahm die Aktivität bei niedrigen und hohen Glukosekonzentration wieder ab. Auffallend war aber eine erneute intensive Aktivierung von ERK1/2 nach 48 h bei 16 mM Glukose im Gegensatz zu 3 mM Glukose (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** ERK1/2 Aktivität nach Glukosestimulation. Westernblot-Analyse zeigt eine erhöhte Phospho-ERK1/2 Aktivität nach akuter und chronischer Stimulation mit 16 mM Glukose über einen Zeitraum von 5 min (◊) bis 48 h. Repräsentativer Blot von 3 Experimenten. Eingesetzte Antikörperkonzentration 1:2000.

### *Aktivitätsuntersuchungen der MAPK p38 nach Glukoseexposition*

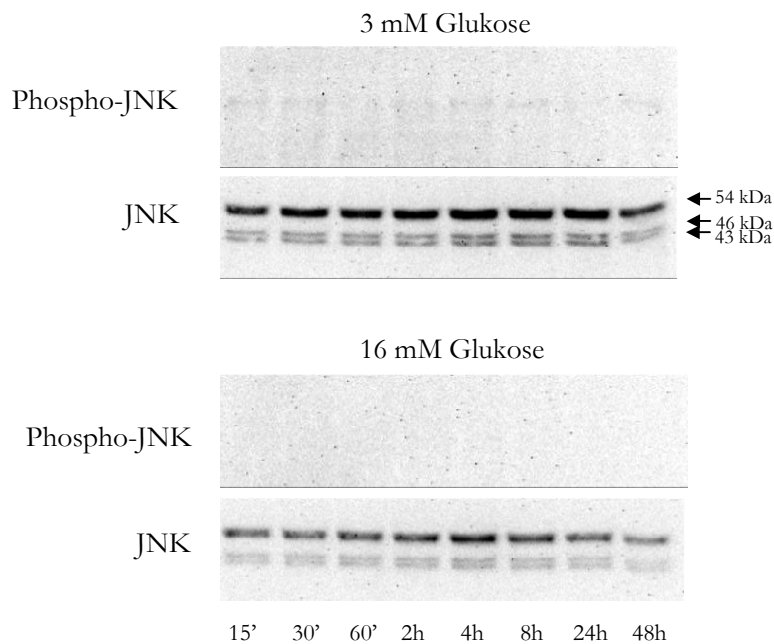
Die Untersuchung der p38 MAPK zeigte eine kontinuierliche Zunahme der Phosphorylierung bei 16 mM Glukose mit maximaler Aktivierung nach 48 h. Im Gegensatz dazu, war bei 3 mM Glukose keine Zunahme der p38 Aktivität zu verzeichnen (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** p38 Aktivität nach Glukosestimulation. Westernblot-Analyse zeigt eine Zunahme der Phospho-p38 Aktivität nach Stimulation mit 16 mM Glukose über einen Zeitraum von 5 min (◊) bis 48 h. Repräsentativer Blot von 3 Experimenten. Eingesetzte Antikörperkonzentration 1:1000.

### ***Aktivitätsuntersuchungen der MAPK JNK nach Glukoseexposition***

Aus Abbildung 24 ist erkennbar, dass bei 16 mM Glukose keine Phosphorylierung der apoptose-induzierenden JNK zu detektieren war. Bei 3 mM Glukose ließ sich eine minimale Aktivierung aufgrund der schwachen Proteinbande nur vermuten, was darauf zurückzuführen war, dass bei niedrigen Glukosekonzentrationen vereinzelte Zellen der Apoptose unterlagen. Dass keine Phosphorylierung der JNK nachzuweisen war, war nicht überraschend, da Glukose in INS-1 Zellen als mitogener Faktor fungierte.

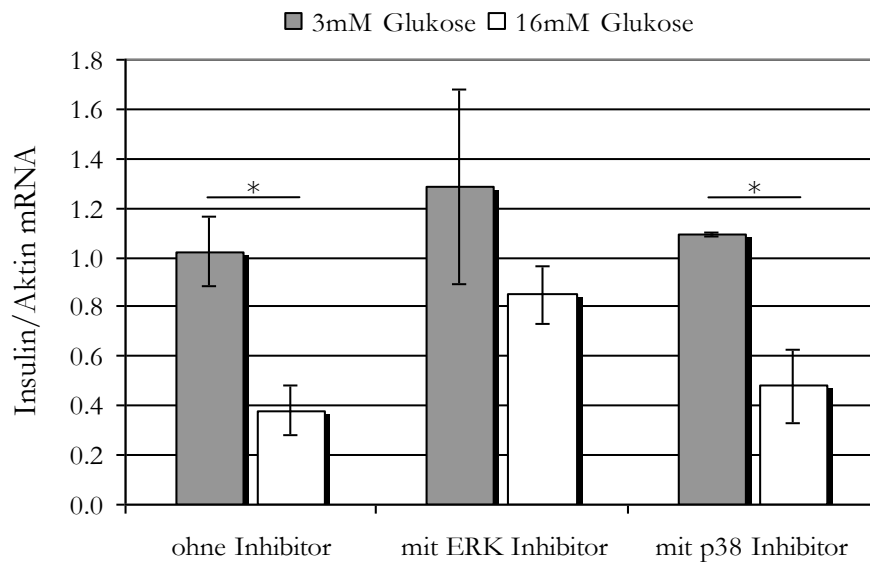


**Abbildung 24:** JNK Aktivität nach Glukosestimulation. Westernblot-Analyse zeigt keine Aktivierung der Phospho-JNK nach Glukosestimulation. Repräsentativer Blot von 3 Experimenten. Eingesetzte Antikörperkonzentration 1:1000.

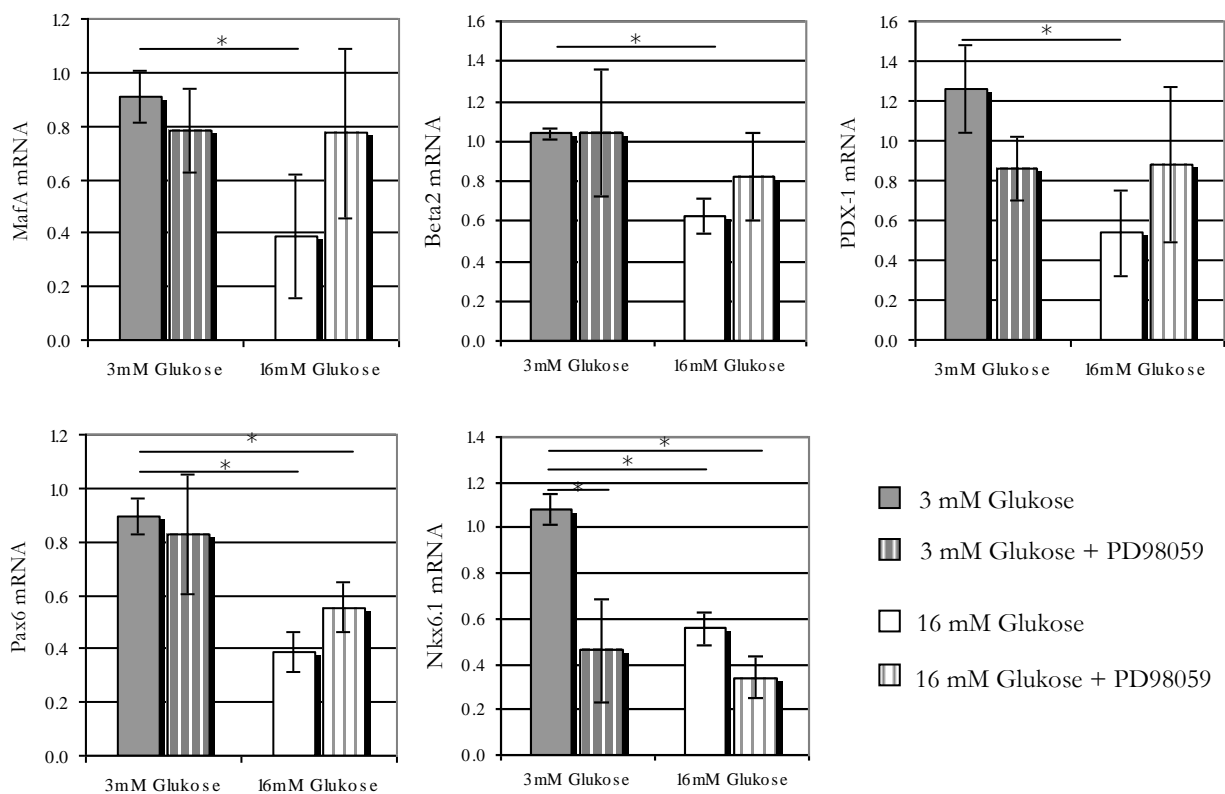
#### **3.2.4.2 Insulin- und Transkriptionsfaktorgenexpression nach ERK1/2 und p38**

##### **Hemmung**

Um im Anschluss daran zu untersuchen, ob die MAPK ERK1/2 und p38 in die Verminderung der Insulingenexpression involviert sind, wurden INS-1 Zellen erneut niedrigen und hohen Glukosekonzentrationen ausgesetzt und mit 40  $\mu$ M des ERK 1/2 Inhibitors PD98059 und 10  $\mu$ M des p38 MAPK Inhibitors SB202190 co-inkubiert. Aus Abbildung 25 ist deutlich erkennbar, dass die Verminderung der Insulingenexpression bei 16 mM nach Hemmung der ERK1/2 vollständig aufgehoben wurde. Eine Inhibierung der p38 Kinase blieb dagegen ohne erkennbaren Effekt.



**Abbildung 25:** Relative Insulingenexpression in INS-1 nach 48 h Exposition mit 3 mM beziehungsweise 16 mM Glukose  $\pm$  MAPK Inhibitoren. Dargestellt sind die MW + SAM von 3 unabhängigen Experimenten mit  $n = 3$  pro Stimulationsbedingung. \* =  $p < 0,01$

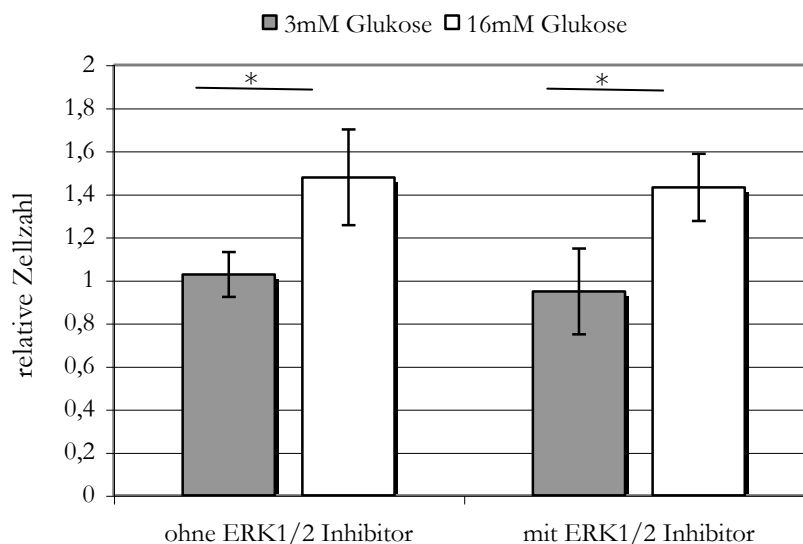


**Abbildung 26:** Relative Genexpression putativer Insulingeninitiatoren in INS-1 nach 48 h Exposition mit 3 mM beziehungsweise 16 mM Glukose  $\pm$  ERK1/2 Inhibitor PD98059. Dargestellt sind die MW + SAM aus 2 unabhängigen Experimenten mit  $n = 3$  pro Stimulationsbedingung. \* =  $p < 0,05$  verglichen mit 3 mM Glukose.

Die verminderte Expression der Insulingenitiatoren PDX-1, MafA,  $\beta$ 2, PAX6 und Nkx6.1 ist möglicherweise die Ursache für den partiellen Verlust der Insulin-mRNA-Expression in INS-1 Zellen bei 16 mM Glukose. Eine erhöhte ERK1/2 Kinase Aktivität nach 48 h bei 16 mM Glukose ließ vermuten, dass ERK1/2 letztendlich über die Regulation der Transkriptionsfaktoren in die Verminderung der Insulingenexpression involviert ist. Die Inhibierung der ERK1/2 Kinaseaktivität resultierte tatsächlich in einer Verbesserung der Genexpression von MafA,  $\beta$ 2 und PDX-1 und PAX-6 nach 48 h mit 16 mM Glukose, obwohl PAX-6 im Vergleich zu 3 mM nach wie vor signifikant vermindert war (Abbildung 26). Die Genexpression von Nkx6.1 dagegen war nach ERK1/2 Inhibierung sowohl basal, als auch bei hohen Glukosekonzentrationen vermindert. Eine direkte Beteiligung von Nkx6.1 an der Regulation der Insulingenexpression ist anhand dieses Ergebnisses auszuschließen.

### 3.2.4.3 Proliferationsverhalten von INS-1 nach ERK1/2 Hemmung

Eine Bestimmung der Zellzahl nach 48 h Glukoseinkubation verdeutlicht, dass trotz ERK1/2 Hemmung die Proliferation nicht vermindert war (Abbildung 27). Allerdings veränderten sich die Zellen, wie zuvor gezeigt wurde funktionell.



**Abbildung 27:** Proliferationsverhalten von INS-1 nach Hemmung der ERK1/2 Aktivität. Relative INS-1 Zellzahl nach 48 h Exposition mit 3 mM beziehungsweise 16 mM Glukose  $\pm$  40  $\mu$ M ERK1/2 Inhibitor PD98059. Dargestellt sind die MW + SAM aus 2 unabhängigen Experimenten mit n = 3 pro Stimulationsbedingung. \* = p < 0,05.

### 3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse, der in Kapitel 3.2 dargestellten Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Chronische Hyperglykämie führte zu einer Verminderung der Insulingenexpression, welche mit einer verminderten Genexpression der Transkriptionsfaktoren MafA,  $\beta$ 2, PDX-1, Pax6 und Nkx6.1 assoziiert war.
2. Chronische Hyperglykämie hatte eine proliferationsfördernde Wirkung zur Folge.
3. Hyperglykämie aktivierte die MAPK ERK1/2 und p38, nicht aber JNK.
4. Eine Inhibierung der MAPK ERK1/2 resultiert in einer Steigerung der Insulingenexpression, der Genexpression der Insulingeninitiatoren MafA,  $\beta$ 2 und PDX-1 und in einer Verbesserung der Genexpression des Differenzierungsfaktors PAX-6.

### 3.3 Untersuchungen zur möglichen Beteiligung des Pentosephosphatweges an der Regulation der Insulingenexpression

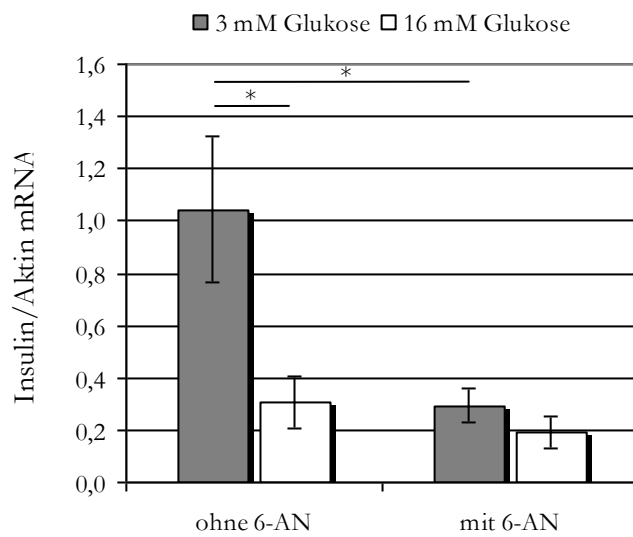
#### 3.3.1 Verminderte Insulingenexpression nach Inhibierung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase

Hohe Konzentrationen von Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat in INS-1 nach chronisch hoher Glukoseexposition legen nahe, dass Glukose-6-Phosphat verstärkt im Pentosephosphatweg verstoffwechselt wird. Um zu testen, ob eine Blockierung des Pentosephosphatweges die Verminderung der Insulingenexpression bei 16 mM Glukose aufhebt, wurden INS-1 erneut für 48 h in 3 mM und 16 mM Glukose kultiviert. Zusätzlich wurden dem Medium 100  $\mu$ M 6-Aminonicotinsäureamid (6-AN) zugesetzt, einem Inhibitor der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase, welche 6-Phosphoglukonat zu Ribulose-5-Phosphat umsetzt, und die Insulin-mRNA wurde bestimmt. Aber tatsächlich zeigte sich das Gegenteil von dem, was erwartet wurde. Wie aus Abbildung 28 ersichtlich ist, führte der Zusatz von 6-AN zu einer starken Verminderung der Insulin-mRNA Spiegel bei 3 mM Glukose ( $p < 0,01$ ).

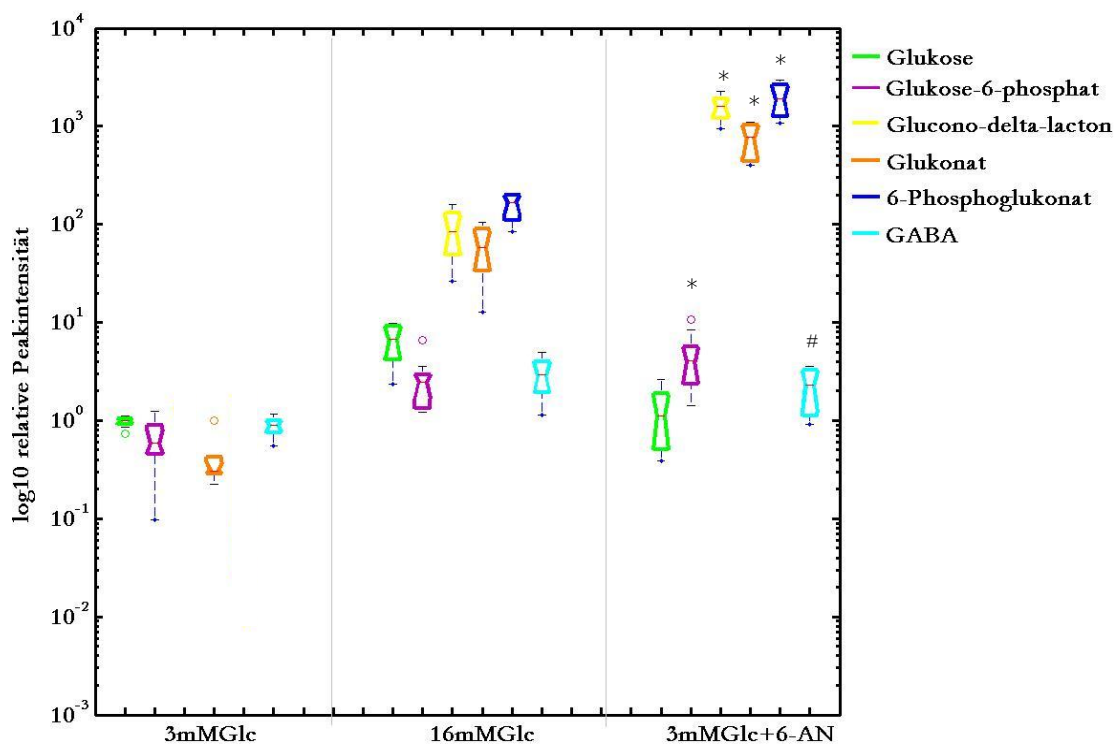
Eine Neumessung der Metaboliten bei 3 mM Glukose mit Zusatz von 6-AN zeigte etwas überraschend eine noch stärkere Akkumulation von Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat auf, als dies bei 16 mM Glukose ohne Inhibitor der Fall war (Abbildung 29). Zu beobachten waren außerdem geringe, aber signifikante Anstiege von Glukose-6-Phosphat und



GABA im Vergleich zu 3 mM Glukose. Hingegen war keine Änderung von Metaboliten der Glykolyse oder des Krebs-Zyklus zu verzeichnen (nicht dargestellt).



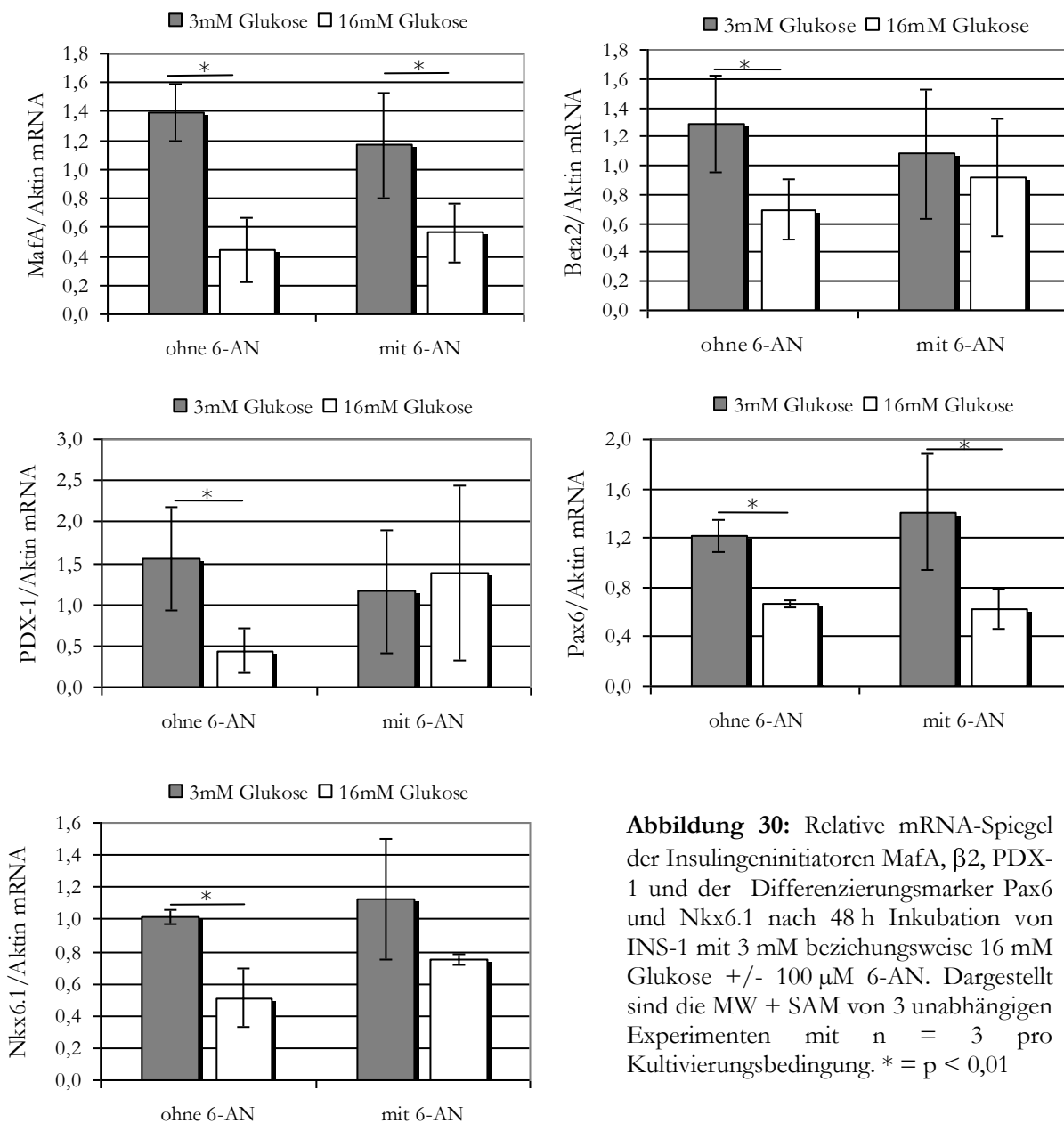
**Abbildung 28:** Relative Insulinexpression nach 48 h Inkubation von INS-1 mit 3 mM beziehungsweise 16 mM Glukose +/- 100  $\mu$ M 6-AN. Dargestellt sind die MW + SAM von 4 unabhängigen Experimenten mit  $n = 3$  pro Kultivierungsbedingung. \* =  $p < 0,01$



**Abbildung 29:** Boxplot zur Darstellung der relativen Peakintensität (logarithmiert) von Metaboliten in INS-1 nach Stimulation mit 3 mM Glukose ( $n = 10$ ), 16 mM Glukose ( $n = 10$ ) beziehungsweise 3 mM Glukose + 100  $\mu$ M 6-AN ( $n = 10$ ). "•" Maximal- beziehungsweise Minimalwert, "-" Median, "▭" Intervall zwischen dem 25%- und dem 75%-Quantil, "o" Werte außerhalb der Quantile. \* =  $p < 0,0005$ , # = 0,005 (nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen) im Vergleich zum jeweiligen Metaboliten bei 3 mM Glukose. Glucono- $\delta$ -lacton und 6-Phosphoglukonat waren bei 3 mM nicht detektierbar.

### 3.3.2 Transkriptionsfaktoranalysen nach Inhibierung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase

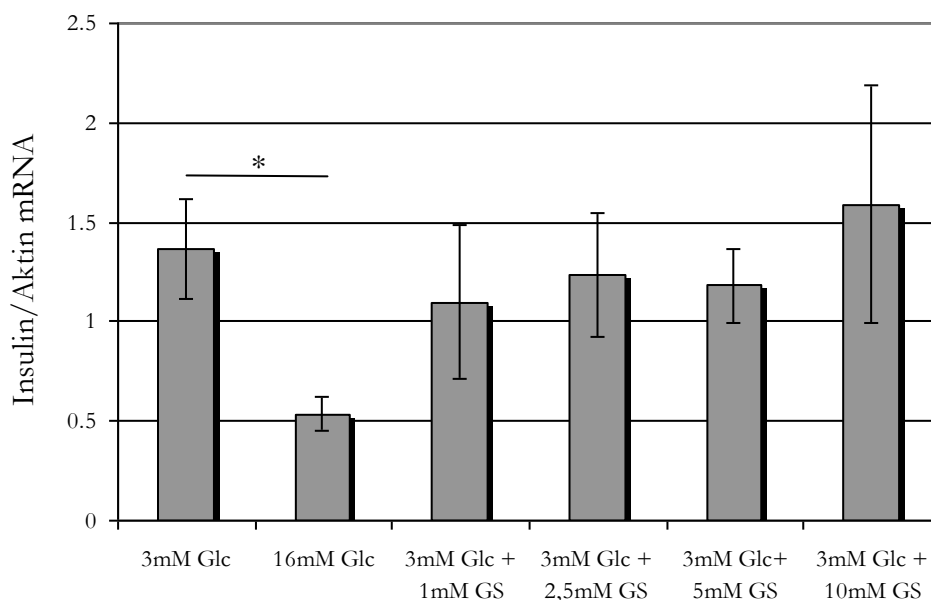
Die Hemmung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase bei 3 mM Glukose mit 100  $\mu$ M 6-AN hatte im Vergleich zu 3 mM Glukose keine signifikante Minderung der Genexpression der Insulingenitiatoren MafA,  $\beta$ 2 und PDX-1 zur Folge (Abbildung 29). Auch die Spiegel der Differenzierungsmarker Pax6 und Nkx6.1 blieben trotz Zugabe von 6-AN unverändert. Allerdings war bei  $\beta$ 2 und PDX-1 eine Aufhebung des Glukose-induzierten Effektes bei den Zellen stimuliert mit 3 mM Glukose + 6-AN im Vergleich zu 16 mM Glukose + 6-AN zu beobachten. Dies könnte in dieser Versuchserie aber ein Artefakt, aufgrund der hohen Standardabweichungen, sein.



**Abbildung 30:** Relative mRNA-Spiegel der Insulingenitiatoren MafA,  $\beta$ 2, PDX-1 und der Differenzierungsmarker Pax6 und Nkx6.1 nach 48 h Inkubation von INS-1 mit 3 mM beziehungsweise 16 mM Glukose +/- 100  $\mu$ M 6-AN. Dargestellt sind die MW + SAM von 3 unabhängigen Experimenten mit  $n = 3$  pro Kultivierungsbedingung. \* =  $p < 0,01$

### 3.3.3 Einfluss von extrazellulär zirkulierendem Glukonat auf die Insulingenexpression

Aus Abbildung 14 ist ersichtlich, dass Glukonat ins Medium abgeben wurde und bei 16 mM Glukose im Mediumüberstand in erhöhten Mengen detektierbar war. Deshalb sollte überprüft werden, ob Glukonat möglicherweise einen Effekt auf die Insulingenexpression durch ein extrazelluläres Signal ausübt. In Abbildung 30 ist das Ergebnis nach Zugabe unterschiedlicher Glukonatkonzentrationen dargestellt. Extrazelluläres Glukonat hatte keinen Einfluss auf die Insulingenexpression. Dies deutet darauf hin, dass - wenn Glukonat an der Regulation der Insulingenexpression beteiligt sein sollte - es diesen Effekt möglicherweise intrazellulär vermittelt. Um diesbezüglich konkretere Aussagen treffen zu können, müssten weiterführende Untersuchungen zunächst eine Glukonataufnahme in die INS-1 Zellen ausschließen und belegt werden, dass Glukonat nur von intrazellulär nach extrazellulär transportiert wird.

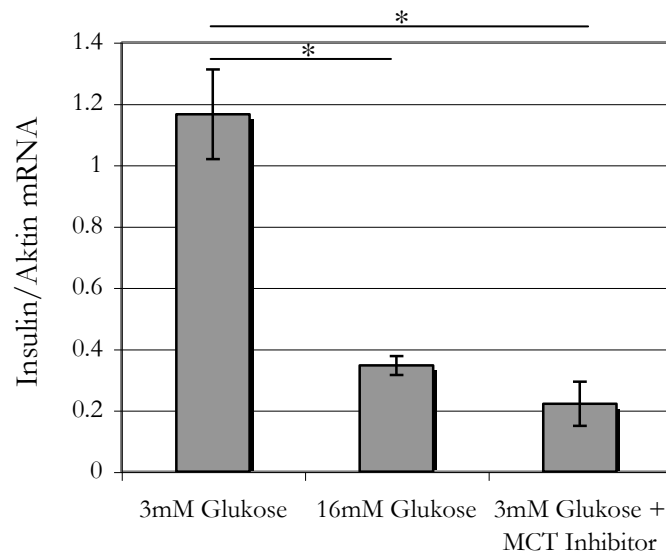


**Abbildung 31:** Extrazellulär zirkulierendes Glukonat hatte keinen Einfluss auf die Insulingenexpression nach 48 h Stimulation. Dargestellt ist der MW + SAM eines repräsentativen Experiments mit  $n = 3$ . Glc = Glukose, GS = Glukonsäure. \* =  $p < 0,01$

### 3.3.4 Inhibierung von Monocarboxylsäuretransportern

Es wurde angenommen, dass ein Anstieg intrazellulärer, aber nicht extrazellulärer Säuren, wie Glukonsäure, mit einer Verminderung der Insulingenexpression assoziiert ist. Da es sich bei Glukonsäure um eine Monocarboxylsäure handelt, sollten Monocarboxyltransporter (MCT) vorhanden sein, die zellulär anfallende Monocarboxylsäuren nach extrazellulär transportieren. Es wurde bereits gezeigt, dass die Anwendung eines Hemmstoffes dieser Transporter, 4-Zimtsäure,

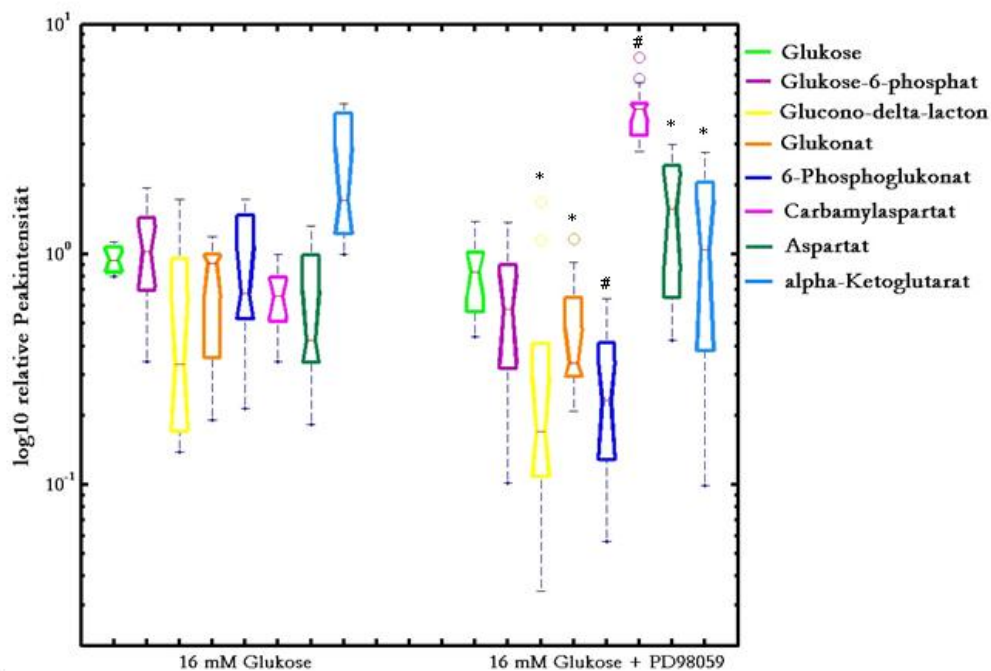
einen Anstieg zellulärer Monocarboxylsäuren zur Folge hat [84]. Um INS-1 chronisch anzusäuern und den Effekt auf die Insulingenexpression zu untersuchen, wurden dem Medium in Anwesenheit von 3 mM Glukose daher 5 mM des MCT Inhibitors 4-Zimtsäure zugegeben. Die Messung der Insulingenexpression zeigte, dass die Zugabe von 4-Zimtsäure eine Verminderung der Insulin mRNA Spiegel zur Folge hatte (Abbildung 31). Es ist daher zu vermuten, dass eine zelluläre Ansäuerung sich negativ auf die Insulingenexpression auswirkt.



**Abbildung 32:** Die Hemmung der MCTs minderte die Insulingenexpression bei 3 mM Glukose nach 48 h. Dargestellt ist der MW + SAM eines repräsentativen Experiments mit  $n = 3$ . \* =  $p < 0,01$

### 3.3.5 Metabolische Veränderungen nach ERK1/2 Kinase Hemmung

Da eine Inhibierung der ERK1/2 Aktivität mit einer Verbesserung der Insulingenexpression einherging, war es von Interesse zu untersuchen, ob dies mit einer Änderung zellulärer Metaboliten im Zusammenhang stehen könnte. In Abbildung 32 ist ersichtlich, dass bei 16 mM Glukose mit Co-Inkubation des ERK1/2 Inhibitors PD98059 die Spiegel von Glucono- $\delta$ -lacton, Glukonat und 6-Phosphoglukonat im Vergleich zu 16 mM Glukose signifikant reduziert waren. Die Spiegel von Glucono- $\delta$ -lacton waren um 56%, von Glukonat um 32% und von 6-Phosphoglukonat um 66% vermindert. Dagegen stieg der initiale Metabolit der Pyrimidin-Synthese, Carbamylaspartat, nochmals signifikant um das 7,1-fache an. Aber auch eine 2,2-fache Zunahme von Aspartat und eine signifikante Minderung von  $\alpha$ -Ketoglutarat um 59% waren bei 16 mM mit PD98059 im Vergleich zu 16 mM Glukose zu beobachten. Das lässt vermuten, dass die Inhibierung der ERK1/2 Kinase eine Stimulation der Fluxrate durch den Pentosephosphatweg initiiert, aber dadurch eine noch stärkere Akkumulation von Carbamylaspartat verursacht.



**Abbildung 33:** Boxplot zur Darstellung der relativen Peakintensität (logarithmiert) von Metaboliten in INS-1 nach Stimulation mit 16 mM Glukose (n = 14) beziehungsweise 16 mM Glukose + PD98059 (n = 15). "•" Maximal- beziehungsweise Minimalwert, "-" Median, "▭" Intervall zwischen dem 25%- und dem 75%-Quantil, "o" Ausreißer. \* =  $p < 0,05$ , # =  $p < 0,0005$  (nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen) im Vergleich zum jeweiligen Metaboliten bei 16 mM Glukose.

### 3.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse, der in Kapitel 3.3 dargestellten Untersuchungen, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Inhibierung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase des Pentosephosphatweges hatte eine Verminderung der Insulingenexpression und des Transkriptionsfaktors MafA bei 3 mM Glukose zur Folge. Der Abfall der Insulingenexpression war assoziiert mit einer enormen Akkumulation von Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat.
2. Die Inhibierung der ERK1/2 Aktivität scheint die Fluxrate durch den Pentosephosphatweg zu erhöhen, was an der Minderung der Spiegel von Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat und dem Anstieg von Carbamylaspartat deutlich wurde. Eine ERK1/2 Hemmung beeinflusste des Weiteren die Synthese Aspartat und  $\alpha$ -Ketoglutarat im Mitochondrium.

## 4 Diskussion

Die Insulingenexpression wurde basierend auf metabolischen Veränderungen des Glukosestoffwechsels bisher wenig untersucht, obwohl der  $\beta$ -Zellglukosestoffwechsel gerade bei einer ernährungsbedingten Entstehung des Typ 2 Diabetes eine kritische Rolle einnimmt. Dass es auf Ebene der Metaboliten bis dato nur vereinzelt Untersuchungen gab, liegt sicherlich auch an der Problematik einer simultanen Erfassung der biochemisch doch sehr vielfältigen Moleküle. Daher haben sich Metabolitenanalysen bisher auf Messungen von einzelnen Targetkomponenten [85] beziehungsweise Komponentengruppen [86] reduziert. Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern Erkenntnisse über eine gesteigerte Verstoffwechslung von Glukose durch den Pentosephosphatweg und dessen mögliche Beteiligung an der ERK1/2 Kinase-vermittelten Regulation der Insulingenexpression.

### 4.1 Chronische hohe Glukose - induzierte metabolische Veränderungen

Eine Messung des metabolischen Profils sollte einen Überblick erlauben, welche Stoffwechselwege unter hyperglykämischen Bedingungen besonders aktiv beziehungsweise beeinträchtigt sind. Die Analyse des Stoffwechsels der INS-1 Zellen ließ erkennen, dass auf diesem Wege die Aufklärung des Mechanismus bis in den molekularen Bereich möglich ist und damit ein Beitrag zum Verständnis des Zellmetabolismus unter spezifischen Bedingungen geleistet werden kann.

#### 4.1.1 Anreicherung von Metaboliten aufgrund eines erhöhten Glukosestoffwechsels

Die simultane Messung intrazellulärer Metaboliten führte zum Ergebnis, dass es in diversen Glukosestoffwechselwegen zum Anstieg einer Vielzahl von Kataboliten kam (Tabelle 3). Dass es sich hierbei größtenteils um Abbauprodukte aus dem Glukosestoffwechsel handelte, konnte durch die Anwendung von [ $^{13}\text{C}$ ]Glukose nachvollzogen werden. Die wichtigsten Stoffwechselwege, in denen ein Anstieg von Metaboliten zu beobachten war, werden im Anschluss diskutiert:

##### ***(I) Glykolyse und Krebszyklus***

Die Metabolitenmessungen ergaben, dass die glykolytischen Metaboliten Glukose-6-Phosphat, Glycerat-3-Phosphat, Phosphoenolpyruvat und Pyruvat in INS-1 bei 16 mM Glukose im Vergleich zu 3 mM Glukose nach 48 h signifikant erhöht waren. Dies ist nicht weiter

überraschend, wenn man bedenkt, dass Glukose insulinunabhängig in die Zelle aufgenommen wird und die Aktivität der Glukokinase mit Zunahme der Glukosekonzentration steigt [55]. Außerdem ist Glukokinase insensitiv gegenüber physiologischen Glukose-6-Phosphat Konzentrationen [87]. Damit unterscheidet sich die Glukokinase deutlich von anderen Hexokinasen, die einen geringen  $K_m$  für Glukose besitzen und bei denen Glukose-6-Phosphat als Feedback-Inhibitor fungiert [88]. Des Weiteren zeigten die Messungen der Glukosephosphatisomerase mRNA-Spiegel, welche Glukose-6-Phosphat zu Fruktose-6-Phosphat umsetzt, dass diese nach 48 h bei 16 mM Glukose erhöht waren. Von einer Beeinträchtigung der Glukoseverstoffwechslung in der Glykolyse kann daher abgesehen werden. Auch die mitochondrialen Metaboliten Citrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat, Fumarat und Malat sind nach 48 h bei 16 mM Glukose erhöht. Es steht damit auch im Mitochondrium nach chronischer Glukosekonzentration genügend Substrat für die Energiegewinnung der Zelle zur Verfügung. Zu erwähnen ist, dass die glykolytischen und mitochondrialen Metaboliten auch nach kurzzeitiger Stimulation (2 h) mit 16 mM Glukose zellulär erhöht waren (nur am Beispiel von Glukose-6-Phosphat gezeigt, Abbildung 12), eine Hauptkomponentenanalyse bei 3 mM beziehungsweise 16 mM Glukose nach 2 h aber noch keine klare Differenzierung der Gruppen zuließ. Die Insulingenexpression war bei 16 mM Glukose nach 2 h im Vergleich zu 3 mM Glukose ebenfalls noch nicht vermindert. Es könnte daher diskutiert werden, dass die glykolytischen und mitochondrialen Metaboliten nicht mit der Verminderung der Insulingenexpression nach 48 h in Zusammenhang stehen.

## ***(II) Sorbitol und Pentosephosphatweg***

Die Verstoffwechslung von Glukose in der Glykolyse und dem Krebs-Zyklus scheint nicht ausreichend zu sein, um das Übermaß an Glukose zu bewältigen. Ein Anstieg an Fruktose könnte ein Indikator dafür sein, dass überschüssige Glukose durch eine ubiquitäre Aldosereduktase direkt zu Sorbitol reduziert und weiter zu Fruktose abgebaut wird. Fruktose könnte weiter über Dihydroxyacetonphosphat und Glycerolphosphat zu Glycerol verstoffwechselt werden.

Des Weiteren ist es denkbar, dass eine gesteigerte Bildung von  $\text{NADP}^+$  durch die Aldosereduktase den Pentosephosphatweg angeregt. Eine wichtige Funktion des Pentosephosphatwegs ist es ebenfalls überschüssige Mengen an Glukose umzuleiten, welche in Form von Fruktose-6-Phosphat und/oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu einem späteren Zeitpunkt in der Glykolyse wieder recycelt werden können. In der Tat war eine starke Akkumulation der Metabolite Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und der Zuckersäure Glukonat, aus dem oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs unter chronisch hohen Glukosekonzentration in INS-1, ein Indiz für das Vorhandensein von ausreichend  $\text{NADP}^+$ . Die

Spiegel von Ribulose-5-Phosphat waren dagegen nur minimal erhöht. Außerdem waren die mRNA Spiegel des Enzyms 6-Phosphoglukonatdehydrogenase, welches 6-Phosphoglukonat zu Ribulose-5-Phosphat umsetzt, erniedrigt (Abbildung 16). Daher ist es möglich, dass es sich bei der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase um ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym handelt. Dies würde die akkumulierenden Mengen an Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat erklären. Dass es sich bei den Pentosephosphatwegmetaboliten Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat nicht nur um einen Anstieg, sondern eine Akkumulation handelte, war an den in Abbildung 11 dargestellten Chromatogrammen deutlich zu erkennen. Unter niedrigen Glukosekonzentrationen sind diese Pentosephosphatwegmetaboliten kaum beziehungsweise überhaupt nicht detektierbar, während sie bei chronisch hohen Glukosekonzentrationen kumulieren. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass diese Anreicherung erst nach 24 h Stunden bei 16 mM Glukose auftritt, also nur unter chronischen Bedingungen (Abbildung 12).

Eine der bedeutendsten Funktionen des Pentosephosphatweg ist außerdem die Erzeugung von reduzierenden Äquivalenten in Form von NADPH für reduktive zelluläre Biosynthesereaktionen. NADPH reduziert das Coenzym Gluthation, welches reaktives  $H_2O_2$  zu  $H_2O$  umwandelt. Weiterhin wird für die Umwandlung von Ribonukleotiden zu Deoxyribonukleotiden NADPH als Elektronenquelle gebraucht. Daher benötigen schnell proliferierende Zellen hohe Mengen an NADPH. Obwohl die zellulären NADPH Spiegel im Rahmen dieser Arbeit nicht gemessen wurden, kann man davon ausgehen, dass ausreichend NADPH zur Verfügung stand. Dabei wird sich auf die Ergebnisse gestützt, dass der NADPH-erzeugende oxidative Teil des Pentosephosphatweg sehr aktiv war und INS-1 bei hohen Glukosekonzentrationen stärker proliferierten als dies bei niedrigen Glukosekonzentrationen der Fall war.

### ***(III) DNA Synthese***

Eine weitere Funktion des Pentosephosphatweg ist es, der Zelle Ribose-5-Phosphat zur Synthese von Nukleotiden und Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich konnten akkumulierende Mengen an Carbamylaspartat detektiert werden, welches aus Carbamylphosphat und Aspartat von der Aspartattranscarbamylase synthetisiert wird. Diese Reaktion ist der erste Schritt in der Pyrimidinbiosynthese. Aspartattranscarbamylase wird durch ATP aktiviert und durch einen erhöhten Glykolysefluss steht davon vermutlich genügend zur Verfügung. Eine verstärkte Pyrimidinbiosynthese ist möglicherweise ebenfalls eine Erklärung für die verstärkte Proliferation von INS-1 unter hyperglykämischen Bedingungen. Allerdings wird auch vermutet, dass akkumulierende Mengen an Carbamylaspartat die Ursache einer geminderten Aktivität der Carbamylaspartatdihydroorotase sind. In der Literatur wird darauf hingewiesen, dass die Aktivität



des Enzyms Carbamylaspartatdihydroorotase, welches Carbamylaspartat weiter zu Orotat umsetzt, stark vom intrazellulären pH-Wert ( $pH_i$ ) abhängt. So nimmt der  $K_m$  für Carbamylaspartat mit Absinken des  $pH_i$  ab [89-91]. Die Anreicherung einer Vielzahl organischer Säuren in den INS-1 Zellen bei 16 mM Glukose könnte damit in Verbindung stehen.

#### ***(IV) GABA Synthese***

Chronisch hohe Glukosekonzentrationen führten zu einem Anstieg der zellulären GABA Spiegel, welches außer in Gehirn auch in relativ hohen Konzentrationen im Pankreasgewebe gebildet wird [92]. Vermutungen zufolge könnte es in Inseln als interzelluläres Signalmolekül – als parakriner oder autokriner Regulator der Insulinsekretion oder Glukagonsekretion fungieren [93, 94]. GABA wird aus Glutamat von der Glutamatdecarboxylase synthetisiert und Glutamat wiederum wird möglicherweise unter Katalyse von Alaninaminotransferase aus  $\alpha$ -Ketoglutarat und Alanin gebildet. Jüngste Studien in Ratten  $\beta$ -Zellen zeigten, dass eine 24 h Inkubation bei 20 mM Glukose die GABA Sekretion supprimiert [95]. Vermutlich führen metabolische Veränderungen nach chronisch hoher Glukoseexposition nicht nur zu einer verminderten Insulinsekretion, sondern auch zu einer verringerten GABA Sekretion. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sowohl Insulin als auch GABA in Vesikel verpackt und calciumabhängig sezerniert werden [96]. Geht man davon aus, dass die GABA Sekretion in INS-1 unter chronisch hohen Glukosekonzentrationen ebenfalls gehemmt ist, würde das die zelluläre Anreicherung von GABA bei gleichbleibender Synthese erklären. Es kann momentan aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Synthese von GABA bei 16 mM Glukose aufgrund des erhöhten Glukosestoffwechsels einfach erhöht war, da die Experimente mit  $[C^{13}]$ Glukose den Ursprung aus dem Glukoseabbaustoffwechsel bewiesen.

## **4.2 Chronisch hohe Glukose - induzierte Verminderung der Insulin-genexpression**

In diesem Versuchsabschnitt ging es anfänglich um die Charakterisierung der INS-1  $\beta$ -Zellfunktion unter chronisch hohen Glukosebedingungen. In den sich anschließenden Untersuchungen gelang es zu zeigen, dass eine Inhibierung der ERK1/2 Kinaseaktivität trotz chronisch hoher Glukosekonzentrationen keine Minderung der  $\beta$ -Zellinsulingenexpression zur Folge hatte.

#### 4.2.1 $\beta$ -Zelldifferenzierung unter chronisch hohen Glukosekonzentrationen

##### *Verminderte Insulingenexpression*

Chronisch hohe Glukosekonzentrationen resultierten in der Verminderung der Insulingenexpression, die mit einer Verminderung wichtiger Insulingenregulatoren einherging. Dazu zählen die Transkriptionsfaktoren MafA,  $\beta$ 2 und PDX-1. Ähnliche Beobachtungen wurden in HIT-T15  $\beta$ -Zellen mit Glucocorticoiden gemacht. So ging eine gestörte Insulinsynthese in HIT-T15  $\beta$ -Zellen mit einer Verminderung der  $\beta$ 2 und PDX-1 mRNA Spiegel einher [97]. Überraschenderweise konnte im Zusammenhang mit dieser Arbeit keine Literatur gefunden werden, die ebenfalls von einer Minderung der MafA-mRNA Spiegel bei chronischer Hyperglykämie berichtet. Lediglich Harmon et al. beobachteten unveränderte MafA-mRNA Spiegel in glukotoxischen HIT-T15 Zellen [35]. Das Glukosetoxizitätsmodell unterschied sich allerdings deutlich von dem hier angewandten. So wurden HIT-T15 Zellen kontinuierlich bei 11 mM Glukose kultiviert und Zellen in Passage 71-75 als nicht glukosetoxisch, aber Zellen in Passage 123-128 als glukosetoxisch bezeichnet. Eine Vergleichsmessung der MafA-mRNA Spiegel bei physiologischen und supraphysiologischen Glukosekonzentrationen wurde in jenem Fall nicht durchgeführt. Es ist anzunehmen, dass eine Reduktion der MafA,  $\beta$ 2 und PDX-1 mRNA-Spiegel in INS-1 bei chronisch hoher Glukose eine verminderte Proteinsynthese nach sich zieht, was eine Verminderung der Insulingenexpression erklären könnte. Dies ist für PDX-1 der Fall, dessen mRNA und Protein Spiegel in glukotoxischen HIT-T15 Zellen vermindert waren [31]. Bisher konzentrierten sich die Untersuchungen dieser Transkriptionsfaktoren vor allem auf Promotorbindungsaktivitäten. So konnte gezeigt werden, dass eine Beeinträchtigung der Insulingenexpression aufgrund anhaltender Kultur bei hohen Glukoskonzentrationen vor allem mit einer verminderten Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren PDX-1 [98] und MafA assoziiert ist [32, 99]. Experimentelle Daten, dass die  $\beta$ 2 Expression bei chronischer Hyperglykämie vermindert ist, sind derzeit nicht bekannt. Es wäre daher von Interesse die  $\beta$ 2 Expression in anderen  $\beta$ -Zelltypen zu untersuchen, welche die hier dargestellten Ergebnisse belegen könnten. Dass  $\beta$ 2, genauso wie PDX-1 und MafA ein wichtiger Regulator der Insulingentranskription ist, zeigt die Tatsache, dass diese Transkriptionsfaktoren, alleine exprimiert, schwache Transaktivatoren des Insulinpromotors sind. Werden diese drei Faktoren dagegen co-exprimiert wird der Insulinpromotor in starkem Maße aktiviert [81, 100-102]. Es wird von einer synergistischen Aktivierung der Insulingentranskription durch direkte Protein-Protein Interaktionen dieser Faktoren ausgegangen. Dass MafA sowohl mit PDX-1 als auch  $\beta$ 2 interagiert, konnte bereits von Zhao et al. demonstriert werden [100]. Eine Beeinträchtigung der

Insulingenexpression kann auch durch den Verlust dieser Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern hervorgerufen werden. So konnten Harmon et al. den Verlust von MafA aus dem Zellkern in HIT-T15 Zellen bei anhaltender Kultur unter hohen Glukosekonzentrationen beobachten [35]. Auch PDX-1 wird unter oxidativen Stressbedingungen nach Einsatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [103] und unter chronisch hohen Glukosebedingungen [104] vom Zellkern ins Zytoplasma transloziert.

Die Verminderung der Insulingenexpression scheint in direktem Zusammenhang mit dem Glukosestoffwechsel zu stehen, da Zucker ähnlicher Struktur, wie Fruktose und Sorbitol nach chronisch hoher Inkubation keinen Einfluss auf die Insulingenexpression zeigten. Entgegen bisheriger Untersuchungen hatte in INS-1 auch Ribose keinen Einfluss auf die Insulingenexpression (Abbildung 20), obwohl es in HIT-T15 Zellen zur gezielten Generierung von ROS und zur Untersuchung von Glukosetoxizität eingesetzt wurde [105-107]. Möglicherweise ist der Effekt zelltypabhängig. Allerdings wurden auch Ribosekonzentrationen von mehr als 40 mM eingesetzt.

### ***Glukose als mitogener Faktor***

In der Zelllinie INS-1 konnte außerdem beobachtet werden, dass Glukose als mitogener Faktor fungiert, indem es die Zellproliferation steigerte (Abbildung 17). Das bestätigt Untersuchungen aus anderen  $\beta$ -Zelllinien, wie MIN-6, bei denen Glukose das  $\beta$ -Zellüberleben erhöht [108]. *In vitro* und *in vivo* Studien in Inseln von gesunden Ratten ohne Tendenz zum Diabetes mellitus zeigten ebenfalls, dass Glukose ein potenter Stimulator des  $\beta$ -Zellwachstums ist [109, 110]. Hoorens et al. berichteten sogar, dass das  $\beta$ -Zellüberleben mit Zunahme der Glukosekonzentration steigt und die Apoptoserate sinkt [111]. Jedoch gibt es auch Studien, die das Gegenteil zeigen. *In vitro* Studien in anderen Nagernmodellen beobachteten  $\beta$ -Zellapoptose nach Exposition mit hoher Glukose [112, 113]. Auch eine anhaltende Kultur von normalen humanen Inseln bei erhöhter Glukosekonzentration induzierte  $\beta$ -Zellapoptose [114]. Da es sich bei INS-1 Zellen und MIN-6 Zellen um Insulinomazellen handelt ist es gut möglich, dass Glukose die Proliferation steigert, da Glukose für Tumorzellen eine wichtige Energiequelle darstellt [115] und ein hoher Glukosekonsum von Tumorzellen ist wohl bekannt seit den Untersuchungen von Otto Warburg [116]. Eine Glukose-induzierte kontinuierliche Erhöhung der Proliferationsrate in INS-1 geht mit einem starken Anstieg der mRNA und Proteinspiegel von p8 einher [117]. Die Überexpression dieses Proteins in verschiedenen Zellkulturmodellen ist mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert [118, 119]. In Tumorzelllinien anderer Gewebe konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Hyperglykämie die Zellproliferation anregt [120]. Die

kontroversen Untersuchungen an gesunden isolierten Inseln erfordern allerdings weitere Untersuchungen. Das unterschiedliche experimentelle Design spielt sicherlich eine entscheidende Rolle. Zum einen ist die Glukosekonzentration und zum anderen die Dauer der Inkubation entscheidend für das  $\beta$ -Zellüberleben. Es ist durchaus denkbar, dass Glukose im prädiabetischen Zustand bis zu einem gewissen Maße zu einer gesteigerten Proliferation der  $\beta$ -Zellen führt. Ein über Jahre erhöhter Blutzucker kann letztendlich aber zur Anreicherung toxischer Glukoseabbauprodukte führen und damit zum  $\beta$ -Zelltod. Letztendlich scheint die Verstoffwechslung hoher Mengen an Glukose eine Dedifferenzierung der INS-1  $\beta$ -Zellen zu verursachen, die sich in einer verstärkten Proliferation der Zellen bei gleichzeitiger Verminderung der Insulingenexpression äußert.

#### 4.2.2 Erholung der Insulingenexpression nach ERK1/2 Inhibierung

Kinaseaktivitätsuntersuchungen in INS-1 zeigten, dass eine Glukoseinkubation die Aktivität der ERK1/2, sowohl bei akuter, als auch bei chronischer Glukose erhöht. Dies lässt vermuten, dass entweder metabolische Veränderungen im Glukosestoffwechsel selbst oder durch einen verstärkten Glukosemetabolismus entstehende zelluläre Veränderungen eine erneute ERK1/2 Aktivitätszunahme nach langanhaltender Stimulation mit 16 mM Glukose (Abbildung 22) hervorrufen. Dass Glukosestimulation die Aktivität von ERK1/2 nach kurzzeitiger Inkubation steigert belegen vorangegangene Untersuchungen in INS-1 Zellen [121, 122]. Aus den hier vorliegenden Untersuchungen geht auch hervor, dass die Aktivität der p38 Kinase, welche unter anderem durch osmotischen Stress reguliert wird, in INS-1 bei 16 mM Glukose erhöht ist. Dass osmotische Veränderungen bei der Regulierung des Insulingens aber keine wesentliche Rolle spielen, konnte zum einen durch den Einsatz des nichtmetabolisierbaren Mannitols gezeigt werden, das im Gegensatz zu Glukose keine Verminderung der Insulingenexpression hervorruft. Zum anderen resultierte die Inhibierung der p38 Kinaseaktivität in keiner Verbesserung der Insulin-mRNA Spiegel. Des Weiteren wird auch ausgeschlossen, dass die JNK Kinase an der Regulierung des Insulingens unter hyperglykämischen Bedingungen beteiligt ist. Eine Aktivierung dieser Kinase nach 2-tägiger Glukosestimulation konnte überhaupt nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist die JNK Kinase hauptsächlich in Apoptose-induzierende Prozesse, hervorgerufen durch inflammatorische Faktoren [123-125] involviert. Da die INS-1 Zellen bei hoher Glukosekonzentration dazu neigen stärker zu proliferieren, wird eine Involvierung der JNK-Kinase bei der Verminderung der Insulingenexpression ausgeschlossen.

Um die Annahme zu prüfen, dass eine verstärkte Aktivierung der ERK1/2 unter chronisch hohen Bedingungen in die Regulation der Insulingenexpression involviert ist, wurde die ERK1/2 Kinaseaktivität gehemmt. Eine Inhibierung der ERK1/2 Kinaseaktivität war mit einer Verbesserung der Insulingenexpression bei chronisch hohen Glukosekonzentrationen verbunden (Abbildung 25). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass eine verstärkte Aktivierung der ERK1/2 Kinase die Insulingentranskription negativ reguliert. Diese Daten passen zu Untersuchungen publiziert von Lawrence et al. Diese zeigten, dass eine Inhibierung der Insulinpromotoraktivität nach chronischer Glukosestimulation von der Aktivität der ERK1/2 MAPK abhängig ist [38]. Tatsächlich war eine Erholung der Insulingenexpression auch mit einer Verbesserung der Genexpression der Transkriptionsfaktoren MafA,  $\beta 2$ , PDX-1 und Pax6 verbunden (Abbildung 26). Dass die ERK1/2 Kinase ihre glukose-induzierte Wirkung im Zellkern ausübt, konnte bereits gezeigt werden [122]. Die Transkriptionsfaktoren  $\beta 2$  und PDX-1 sind Targets der ERK1/2 Kinase und können durch diese phosphoryliert werden [126]. Außerdem zeigen jüngste Untersuchungen von Lawrence et al., dass MafA-NFAT Komplexe unter Bedingungen, welche die Promotoraktivität stimulieren, mit A2C1 Promotorelementen in einer ERK1/2-abhängigen Weise assoziieren [38]. Es wurde auch berichtet, dass ERK2 C/EBP $\beta$  phosphoryliert, obwohl C/EBP $\beta$  die Aktivierung der Insulintranskription inhibieren soll [127-129]. Lawrence et al. gelang es daher auch zu zeigen, dass unter Bedingungen, welche die Promotoraktivität inhibieren, C/EBP $\beta$ -NFAT Komplexe gebildet werden und MafA-NFAT Komplexe verloren gingen [38]. Aufgrund dieser Befunde postuliert der Autor bei chronisch hoher Glukose eine erhöhte Präsenz negativer Regulatoren im Zellkern, die dann bevorzugt aktiviert werden könnten. Obwohl in dieser Arbeit kein Anstieg von C/EBP $\beta$  auf RNA Ebene gezeigt werden konnte, ist es denkbar dass die Regulation dieses Transkriptionsfaktors auf Proteinebene stattfindet. Eine Untersuchung zur verstärkten Translokalisierung, dieses vorrangig im Zytoplasma lokalisierten Faktors, in den Zellkern würde hierzu weitere Hinweise liefern. Und insofern sind künftig Translokalisationsstudien in  $\beta$ -Zellen unter chronisch hohen Bedingungen mit C/EBP $\beta$  wünschenswert.

### **4.3 Kritische Rolle des Pentosephosphatweges bei der Regulation der Insulingenexpression**

Es wird davon ausgegangen, dass Glukose verstoffwechselt werden muss, um ihren Effekt auf die Insulinexpression und Sekretion auszuüben. Störungen im Glukosestoffwechsel beziehungsweise eine Beeinträchtigung des Glukoseflux könnte erhebliche Auswirkungen auf die

Zellfunktion nach sich ziehen. Die Akkumulation der, unter 3 mM Glukose nicht beziehungsweise kaum nachweisbaren, Pentosephosphatwegmetaboliten Glucono- $\delta$ -lacton, Glukonat und 6-Phosphoglukonat bei 16 mM Glukose nach 48 h ließ eine kritische Rolle dieser bei der Regulation der Insulingenexpression vermuten.

Es konnte bereits 1968 von Matschinsky und Ellerman gezeigt werden, dass akute Hyperglykämie eine Zunahme der 6-Phosphoglukonatspiegel in isolierten Mäuseinseln verursacht [130]. Daraufhin vermuteten sie eine mögliche Rolle des Pentosephosphatweges bei der Insulinsekretion. Matschinsky et al. schlossen aber noch im selben Jahr diese Annahme aus, indem sie zeigten, dass ein Anstieg an 6-Phosphoglukonat, im Vergleich zu Glukose und Glukose-6-Phosphat zu zeitverzögert auftrat, um den Mechanismus der Insulinsekretion zu steuern [131]. Stattdessen kamen sie zum Entschluss, dass eine Aktivierung des Pentosephosphatweges bei der Stimulierung der RNA Synthese eine entscheidende Rolle spielt, indem Präkursor für die RNA bereitgestellt werden. Ihre Vermutungen stützen sie auf Beobachtungen einer akuten Hyperglykämie-assoziierten Steigerung der RNA-Synthese in Inseln [132]. Außerdem zeigten Tracerstudien eine Verstoffwechslung von Glukose im Pentosephosphatweg [133]. Obwohl es mittlerweile bekannt und akzeptiert ist, dass im Pentosephosphatweg Ribose-5-Phosphat für die RNA und DNA Synthese bereitgestellt wird, hat die Rolle des Pentosephosphatweges in der chronischen Hyperglykämie-assoziierten Verminderung der Insulingenexpression bisher kaum Beachtung gefunden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten metabolischen Analysen in INS-1 zeigten nach 48 h Inkubation mit 16 mM Glukose eine Anreicherung von intrazellulärer Glukose und Glukose-6-Phosphat, die vermutlich auf eine Akkumulation der Pentosephosphatwegprodukte Glukonat, 6-Phosphoglukonat und Glucono- $\delta$ -lacton zurückzuführen ist und durch einen Rückstau verursacht wird. Die verminderten mRNA Spiegel der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase sind möglicherweise die Ursache für eine verminderte Enzymaktivität. Damit wäre eine Weiterverstoffwechslung von 6-Phosphoglukonat im Pentosephosphatweg gebremst, was die Anstauung der Metabolite Glucono- $\delta$ -lacton, Glukonat und 6-Phosphoglukonat erklären würde.

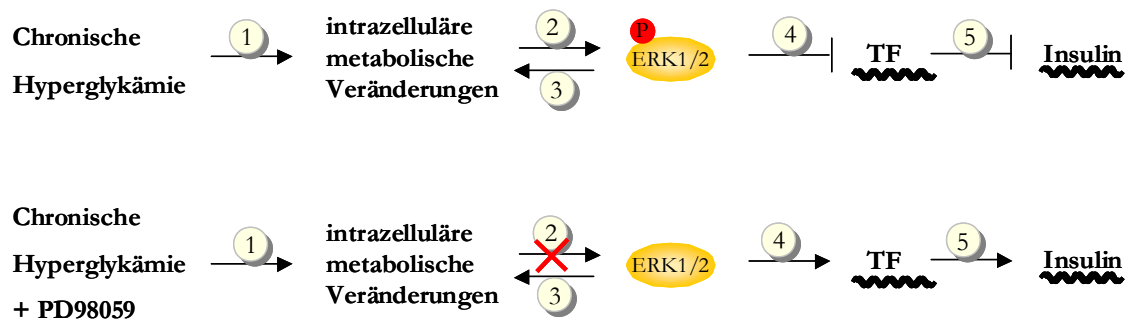
Die Inhibierung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase bei 3 mM Glukose mit dem Antimetaboliten 6-AN führte ebenfalls zu einem zellulären Anstieg von Glukose-6-Phosphat, was die Annahme bestärkt, dass dies eine Folge einer starken Akkumulation von Glukonat, 6-Phosphoglukonat und Glucono- $\delta$ -lacton war (Abbildung 29). Ein Anstieg glykolytischer und mitochondrialer Produkte war unter diesen Bedingungen nicht zu beobachten. Die Tatsache, dass die Insulingenexpression bei 3 mM Glukose und 6-AN Co-Inkubation stark vermindert war

(Abbildung 28), könnte folgende Ursachen haben. Zum einen ist es denkbar, dass entweder eines der Pentosephosphatwegprodukte, Glukonat, 6-Phosphoglukonat oder Glucono- $\delta$ -lacton, durch dessen Akkumulation oder ein Anstau aller dieser Metaboliten die Insulingenexpression regulieren. Auch die Insulinsekretion ist in isolierten Inseln von 6-AN-behandelten Ratten erheblich beeinträchtigt [134]. Zum anderen muss aber eingeräumt werden, dass durch die Anwendung von 6-AN, wenn auch nur partiell, essentielle Stoffwechselwege gehemmt werden. An den Pentosephosphatweg schließen sich die Purin- und die Pyrimidinbiosynthese an und die Pyrimidinsynthese stellt Intermediärprodukte für die RNA-Synthese bereit. Eine Hemmung des Pentosephosphatweges hat möglicherweise unabhängig von den Metabolitenveränderungen eine Hemmung der RNA-Synthese zur Folge. Obwohl also eine Inhibierung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase mit 6-AN bei 3 mM Glukose eine ähnliche metabolische Situation schafft, wie die alleinige Anwendung von 16 mM Glukose, sind Zweifel an der Rolle des Pentosephosphatweg unter diesen Bedingungen berechtigt. Allerdings waren die mRNA-Spiegel der Insulingeninitiatoren MafA,  $\beta$ 2 und PDX-1 und der Differenzierungsmarker Pax6 und Nkx6.1 bei 3 mM Glukose mit 6-AN nicht vermindert. Dies bestätigt die Vermutung einer generellen Hemmung der RNA Synthese nicht. Es stellt sich allerdings die Frage, ob eine Verminderung der Insulingenexpression auch Transkriptionsfaktor-unabhängig auftreten kann. Eine Mikroinjektion der Pentosephosphatwegmetaboliten könnte eine spezifische Rolle dieser bei der Regulierung der Insulingenexpression aufklären. Diese Methode ist allerdings nur bei Einzelzellen anwendbar und eine RNA-Isolierung mit genügend Ausbeute schwer realisierbar.

#### **4.4 Mögliche ERK1/2 - abhängige Regulierung der Insulingenexpression durch Glukosestoffwechselmetaboliten**

Eine Inhibierung der ERK1/2 Kinaseaktivität bei 16 mM Glukose resultierte in einer Verbesserung der Insulingenexpression. Damit assoziiert war eine partielle Minderung der zellulären Spiegel von Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat (Abbildung 32). Da simultan in Anwesenheit des ERK1/2 Inhibitors eine noch stärkere Akkumulation von Carbamylaspartat zu beobachten war, als dies bei 16 mM Glukose allein der Fall war, könnte angenommen werden, dass die ERK1/2 Inhibierung in einer Stimulation der Glukosefluxrate durch den Pentosephosphatweg resultierte. Wegen des Fehlens von Daten, die genau belegen, dass ERK1/2 den Glukoseflux durch den Pentosephosphatweg reguliert (und wenn ja, auf welchem Weg) beziehungsweise ob Pentosephosphatprodukte die ERK1/2 Kinase aktivieren, kann bisher noch keine definitive Aussage getroffen werden, ob ein Zusammenhang zwischen einer Störung des Pentosephosphatweges und einer ERK1/2 - vermittelten Regulation der

Insulingenexpression besteht. Es bleibt zu untersuchen, ob ERK1/2 möglicherweise die Aktivität der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase reguliert. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass ERK1/2 ihren Effekt nicht nur im Zellkern ausübt, sondern auch zytosolische Targets hat. So ist ERK1/2 in der Lage andere Proteinkinasen, wie die p90ribosomal S6 Kinase [135] oder das NADPH Oxidase System zu aktivieren [136]. Des Weiteren waren nach ERK1/2 Inhibierung bei 16 mM Glukose die Aspartatspiegel erhöht und die  $\alpha$ -Ketoglutarat Spiegel gesenkt. Man könnte spekulieren, dass das mitochondrial entstehende Oxaloacetat verstärkt zu Aspartat umgewandelt wird und dies zu einer Senkung der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Spiegel führte. Daher erlauben die aus dieser Arbeit hervorgegangenen Ergebnisse ein Modell der ERK1/2 - beteiligten Regulierung der Insulingenexpression über zelluläre Stoffwechselveränderungen vorzuschlagen (Abbildung 34).



**Abbildung 34:** Modell einer möglichen ERK1/2 - beteiligten Regulierung der Insulingenexpression durch Stoffwechselveränderungen bei chronischer Hyperglykämie. Chronische Hyperglykämie führt zu metabolischen Veränderungen (z. B. gesteigerter Glukosestoffwechsel) (1), welche eine verstärkte Phosphorylierung der ERK1/2 Kinase zur Folge haben (2). Damit assoziiert ist eine Minderung der Genexpression von Transkriptionsfaktoren (TF) (4) und eine Minderung der Insulingenexpression (5). Eine Hemmung der ERK1/2 Kinaseaktivität mit PD98059 bei chronischer Hyperglykämie führt ebenfalls zu Veränderungen im Glukosemetabolismus (3), welche mit einer Verbesserung der Genexpression von Transkriptionsfaktoren und des Insulins assoziiert sind.

Wie bereits diskutiert resultieren chronisch hohe Glukosekonzentrationen in einem Anstieg von zellulärem Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat, Glukonat. Ebenfalls ist die Exkretion von Glukonat in das Kulturmedium bei 16 mM Glukose nach 48 h erhöht, was auf einen metabolischen Stau im oxidativen Teil des Pentosephosphatweg hindeutet. Da das Zytosol normalerweise leicht alkalisch und der Nukleus leicht säuerlich sind, wäre es nicht überraschend, dass Glukonat in das Medium abgegeben wird. Die Aufrechterhaltung des zellulären bioelektrischen Potentials und des Säure-Base-Haushaltes sind lebenswichtig zur Aufrechterhaltung einer optimalen Zellfunktion. Es könnte spekuliert werden, dass zellulär



akkumulierende Mengen dieser Metaboliten ein Signal für einen zu hohen Flux von Glukose durch den Pentosephosphatweg sind, den es zu bremsen gilt. Verminderte mRNA Spiegel der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase sind ein Indiz dafür, dass dies möglicherweise auch der Fall ist. Es gilt weiterhin genauer zu untersuchen, ob die ERK1/2 Kinase in der Lage ist diesen Prozess über die Regulierung der 6-Phosphoglukonatdehydrogenase zu steuern. Angenommen eine Aktivierung der ERK1/2 Kinase bei chronisch hoher Glukose wird aufgrund einer Störung im Pentosephosphatweg induziert und der Flux durch den Pentosephosphatweg dadurch gebremst. Unter anhaltenden hohen Glukosebedingungen würde dies zu einer noch stärkeren Akkumulation von Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonat und Glukonat führen. Durch diesen Rückkopplungsmechanismus würde sich die zelluläre metabolische Situation stetig verschlimmern.

Letztlich zeigten die Analysen auch, dass ERK1/2 womöglich nicht nur durch extrazelluläre Rezeptor-vermittelte Stimuli aktiviert werden kann. In INS-1 Zellen wurde deutlich, dass auch zelluläre Stoffwechseleränderungen eine Phosphorylierung, und damit Aktivierung, der ERK1/2 Kinase initiieren können. Des Weiteren scheint sie ihre Wirkung auch nicht nur im Zellkern auf Transkriptionsfaktoren auszuüben, sondern ist vermutlich auch an der Regulierung des Stoffwechsels beteiligt. Eine Hemmung der ERK1/2 Kinaseaktivität und die daraus resultierenden Metabolitenveränderungen machten dies deutlich (Abbildung 33).

## Hypothese

Letztendlich ist anhand der Daten zu erwarten, dass es unter chronisch hohen Glukosekonzentrationen zu einer intrazellulären Ansäuerung kommt. Untersuchungen dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit noch nicht durchgeführt, werden sich aber durch intrazelluläre pH-Messungen ( $pH_i$ ) anschließen. Viele Enzyme und Proteine sind pH-sensitiv und eine Azidifizierung der Zelle würde nicht nur deren Funktion beeinträchtigen, sondern auch das Membranpotential der Zelle, was zur Aufrechterhaltung der Zellfunktion wichtig ist, stören. Den Metabolitenprofilanalysen zu Folge könnten die  $\beta$ -Zellen des Pankreas bei chronisch hoher Glukosekonzentration einer permanenten und sehr hohen Belastung durch endogen gebildete Säuren ausgesetzt sein. Daher ist es denkbar, dass INS-1 Zellen effektive  $pH_i$ -regulierende Mechanismen exprimieren, um den intrazellulären pH-Wert so lange wie möglich stabil zu halten. Zum einen konnte gezeigt werden, dass intrazellulär anfallendes Glukonat ins Medium ausgeschieden wird. Zellulär entsteht Glukonat vermutlich aus Glucono- $\delta$ -lacton durch eine langsame Hydrolyse. Eine Umwandlung in Glukonsäure und dessen Exkretion könnte ein Weg

der Zelle sein überschüssige Stoffwechselabbauprodukte zu eliminieren. Möglicherweise wird Glukonat aktiv über H<sup>+</sup>/Monocarboxylattransporter ausgeschleust. INS-1 Zellen exprimieren Monocarboxylsäuretransporter, während in primären  $\beta$ -Zellen diese Transporter nicht nachgewiesen werden konnten [137]. Weitere Untersuchungen sind daher erforderlich, um besser zu verstehen, wie primäre  $\beta$ -Zellen dem Problem einer endogenen Säurebelastung begegnen. Die Entstehung von CO<sub>2</sub> in den Mitochondrien und Glukonat im Zytosol durch einen permanent gesteigerten Glukosestoffwechsel, stellen eine Quelle der intrazellulären Übersäuerung dar, da sie eine geringe Lipophilität besitzen und damit schlecht permeabel für Zellmembranen sind. H<sup>+</sup>/Monocarboxylattransporter überführen möglicherweise intrazellulär akkumulierende Monocarboxylsäuren nach extrazellulär und entlasten somit die Zellen von den sauren Kataboliten. Eine weitere Strategie von INS-1 der endogenen Säurebelastung zu begegnen könnte über deren verstärkte Proliferation bei chronisch hohen Glukosekonzentrationen erklärt werden. ERK1/2 Kinase steuert proliferative Prozesse. Dass ERK1/2 aufgrund von zellulärer Azidose aktiviert wird und auch die Zelldifferenzierung beeinflusst, konnte in einer Reihe verschiedener Zelltypen bereits nachgewiesen werden [138-140].

#### 4.5 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und die daraus resultierenden Ergebnisse erweitern existierende Erkenntnisse, inwiefern eine Störung des Glukosestoffwechsels die  $\beta$ -Zellfunktion beeinträchtigen könnte. Die Metabolitenprofilanalysen veranschaulichen die Stoffwechselgesamtsituation der Zelle und verdeutlichen, dass andere Glukosestoffwechselwege als die Glykolyse und der Krebszyklus oder wahrscheinlicher simultane Veränderungen in allen Stoffwechselwegen eine kritische Rolle bei der Regulation der  $\beta$ -Zellfunktion unter chronischer Hyperglykämie einnehmen können. Des Weiteren zeigt die Anwendung von Metabolitenprofilen, dass pharmakologische Proteininhibitoren nicht nur auf Proteinebene einen entscheidenden Einfluss haben, sondern auch auf Metabolitenebene zu signifikanten Veränderungen führen können. Die vorliegenden Resultate legen weiterführende Studien nahe, unter anderem die Analyse der Bedeutung des intrazellulären pH bezüglich Insulingenexpression, aber auch Insulinsekretion. In den insulin-sezernierenden beta-TC3 Zellen und anderen Zelltypen und Geweben konnte gezeigt werden, dass eine zelluläre Azidifizierung die Schließung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle hemmt beziehungsweise deren Öffnung aktiviert [141-146], was die Sezernierung von Insulin hemmen würde. Weiterhin ist unklar, ob vergleichbare metabolische Effekte in peripheren Geweben, wie Muskel und Fett stattfinden und auch die Insulinsensitivität möglicherweise auf diesem Weg modifiziert wird.

## 5 Zusammenfassung

Der Glukosestoffwechsel der pankreatischen  $\beta$ -Zellen und die sich daraus ergebende Erhöhung des intrazellulären Konzentrationsverhältnisses von ATP zu ADP stellt das metabolische Signal für die Insulinsekretion dar. Im gesunden, normalen Zustand wird nach akuter Glukoseaufnahme das sezernierte Insulin durch dessen Neusynthese ersetzt. Dieser Prozess setzt eine funktionierende mRNA-Synthese voraus. Unter chronisch hyperglykämischen Bedingungen ist nicht nur die Insulintranskription, sondern auch die Proteinbiosynthese und Sekretion gestört. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit Glukosestoffwechselwege zu identifizieren, die bei der Regulation der Insulingenexpression eine wesentliche Rolle spielen könnten. Des Weiteren sollte eine Assoziation zwischen Glukosemetabolismus und Proteinkinase-assoziiierter Verminderung der Insulingenexpression gefunden werden. Zu diesem Zweck wurden an kultivierten pankreatischen Ratteninsulinomazellen (INS-1) Versuchsserien mit unterschiedlichen Fragestellungen durchgeführt. Anfänglich wurden anhand von Metabolitenprofilanalysen detaillierte Untersuchungen hinsichtlich der Glukoseverstoffwechslung unter chronisch hohen Glukosebedingungen durchgeführt. Aus den Analysen ergab sich, dass chronisch hohe Glukosekonzentrationen überwiegend zu metabolischen Veränderungen im Glukosestoffwechsel führen. Am deutlichsten waren Anreicherungen von glykolytischen und mitochondrialen Metaboliten, mit besonders kumulierenden Mengen von  $\alpha$ -Ketoglutarat, sowie eine Akkumulation von Metaboliten des Pentosephosphatweges. Dabei war besonders eine zelluläre Anreicherung organischer Säuren auffallend. Eine starke Akkumulation der Pentosephosphatwegmetaboliten Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonsäure und Glukonsäure und von Carbamylaspartat, initialer Teil des DNA/RNA Syntheseweges war nur bei chronisch hohen Glukosekonzentrationen zu verzeichnen. Die Spiegel dieser Metaboliten waren in INS-1 während der Kultivierung bei niedriger Glukose extrem niedrig beziehungsweise nicht detektierbar. Bei Glukonat handelt es sich um einen in pankreatischen Zellen neu identifizierten Metaboliten, dessen Herkunft als Glukoseabbauprodukt mit isotopenmarkierter [ $^{13}\text{C}$ ]Glukose nachgewiesen werden konnte. Dessen verstärkte Ausscheidung ins Medium könnte zum einen als Zeichen einer Stoffwechselüberbelastung gedeutet werden und könnte zum anderen eine Möglichkeit der Zelle aufzeigen, eine Anreicherung spezifischer Glukoseabbauprodukte zu kompensieren. Parallel zu den Metabolitenprofilanalysen sollte in INS-1 Zellen bei chronisch hohen Glukose, nach phänotypischer und genotypischer Charakterisierung, ein Proteinsignalweg, assoziiert mit einer Verminderung der Insulingenexpression, identifiziert werden. Voruntersuchungen zeigten, dass chronisch hohe Glukosekonzentrationen zu einer Verminderung der Insulingenexpression, assoziiert mit einer Verminderung der

Insulingeninitiatoren MafA,  $\beta$ 2, PDX-1 und des Differenzierungsfaktors Pax6 führten. Zusätzlich hatten chronisch hohe Glukosekonzentrationen eine Entdifferenzierung der  $\beta$ -Zellen zur Folge, was sich in einer Induktion der Proliferation äußerte. Eine verstärkte Proliferation war möglicherweise auf eine erhöhte Aktivität der ERK1/2 Proteinkinase zurückzuführen. Die Hemmung der ERK1/2 Kinaseaktivität mit PD98059 resultierte in einer Erholung der Insulingenexpression und der positiven Insulingenregulatoren MafA,  $\beta$ 2, PDX-1 und Pax6 nach chronisch hoher Glukoseexposition. Abschließend sollte geklärt werden, ob Metabolitenveränderungen an der Verminderung der Insulingenexpression beteiligt sein könnte und inwiefern die ERK1/2 Kinase dabei eine zentrale Rolle spielt. Eine Inhibierung der 6-Phosphoglukonsäuredehydrogenase des Pentosephosphatweges mit 6-AN resultierte ähnlich wie bei 16 mM Glukose in einer Akkumulation von Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonsäure und Glukonsäure und ging mit einer Verminderung der Insulingenexpression einher. Die Inhibierung der ERK1/2 Kinase hatte trotz chronisch hoher Glukosekonzentrationen keine Verminderung der Insulingenexpression zur Folge und resultierte in einer Verringerung der Pentosephosphatwegmetaboliten Glucono- $\delta$ -lacton, 6-Phosphoglukonsäure und Glukonsäure, aber auch von  $\alpha$ -Ketoglutarat.

Die hier geschilderten Ergebnisse verdeutlichen, dass hohe Glukosekonzentrationen langfristig eine, unter normalen Bedingungen nicht auftretende, intrazelluläre Anreicherung einer Vielzahl von Glukoseabbauprodukten in  $\beta$ -Zellen zur Folge haben. Besonders auffällig ist ein kritischer Anstieg organischer Säuren, welche mit einer ERK1/2 Kinase - vermittelten Verminderung der Insulingenexpression assoziiert sein könnten.

### **Schlussfolgerung**

Eine chronische Erhöhung der Blutglukose dürfte den Stoffwechsel in pankreatischen  $\beta$ -Zellen deutlich modifizieren und zu einer Verschlechterung der  $\beta$ -Zellfunktion beitragen. Ob dies auch Implikationen im Hinblick auf Ernährungsgewohnheiten hat, wie z.B. kohlenhydratreiche Ernährung, ist unklar und sollte tierexperimentell weiter untersucht werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Diabetes Atlas: Executive Summary. International Diabetes Federation. 2nd ed., 2003  
Elektronische Version unter <http://www.idf.org/e-atlas>
- [2] Deutscher Gesundheitsbericht: Diabetes 2008. Deutsche Diabetes Union. Mainz, Kirchheim & Co GmbH, 2007
- [3] Barnett A.H., Eff C., Leslie R.D., Pyke D.A.: Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20:87-93, 1981
- [4] Newman B., Selby J.V., King M.C., et al.: Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 30:763-768, 1987
- [5] Diamond J.: The double puzzle of diabetes. *Nature* 423:599-602, 2003
- [6] Neu A., Feldhahn L., Eehalt S., Hub R., Ranke M.: MODY und Typ-2-Diabetes bei Kindern und Jugendlichen - Häufigkeit und Versorgung. Erste flächendeckende Erhebung in Baden-Württemberg. *Diabetes und Stoffwechsel* 14:119-120, 2005
- [7] Wabitsch M., Hauner H., Hertrampf M., et al.: Type II diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Caucasian children and adolescents with obesity living in Germany. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:307-313, 2004
- [8] Tuomilehto J., Lindstrom J., Eriksson J.G., et al.: Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344:1343-1350, 2001
- [9] Lindstrom J., Ilanne-Parikka P., Peltonen M., et al.: Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* 368:1673-1679, 2006
- [10] Knowler W.C., Barrett-Connor E., Fowler S.E., et al.: Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346:393-403, 2002
- [11] Liebermeister H.: Prevention of Obesity and Lipid Disorders. In *Prevention of Type 2 Diabetes* Ganz M., Ed., John Wiley & Sons Ltd, 2005, p. 203-243
- [12] Devaskar S.U., Giddings S.J., Rajakumar P.A., et al.: Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem* 269:8445-8454, 1994
- [13] Rosenzweig J.L., Havrankova J., Lesniak M.A., Brownstein M., Roth J.: Insulin is ubiquitous in extrapancreatic tissues of rats and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:572-576, 1980
- [14] Poitout V., Stein R., Rhodes C.J.: Insulin gene expression and biosynthesis. In *International textbook of diabetes mellitus.*, 3rd ed. DeFronzo R.A., Ferrannini E., Keen H., Zimmet P., Eds. Chichester, John Wiley & Sons, 2004, p. 98-123

- [15] Melloul D., Ben-Neriah Y., Cerasi E.: Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3865-3869, 1993
- [16] Jonsson J., Carlsson L., Edlund T., Edlund H.: Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371:606-609, 1994
- [17] Peers B., Leonard J., Sharma S., Teitelman G., Montminy M.R.: Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol Endocrinol* 8:1798-1806, 1994
- [18] Aronheim A., Ohlsson H., Park C.W., Edlund T., Walker M.D.: Distribution and characterization of helix-loop-helix enhancer-binding proteins from pancreatic beta cells and lymphocytes. *Nucleic Acids Res* 19:3893-3899, 1991
- [19] Ohneda K., Mirmira R.G., Wang J., Johnson J.D., German M.S.: The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol Cell Biol* 20:900-911, 2000
- [20] Qiu Y., Guo M., Huang S., Stein R.: Insulin gene transcription is mediated by interactions between the p300 coactivator and PDX-1, BETA2, and E47. *Mol Cell Biol* 22:412-420, 2002
- [21] Olbrot M., Rud J., Moss L.G., Sharma A.: Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6737-6742, 2002
- [22] Sharma S., Jhala U.S., Johnson T., et al.: Hormonal regulation of an islet-specific enhancer in the pancreatic homeobox gene STF-1. *Mol Cell Biol* 17:2598-2604, 1997
- [23] Sander M., Neubuser A., Kalamaras J., et al.: Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 11:1662-1673, 1997
- [24] Schisler J.C., Jensen P.B., Taylor D.G., et al.: The Nkx6.1 homeodomain transcription factor suppresses glucagon expression and regulates glucose-stimulated insulin secretion in islet beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7297-7302, 2005
- [25] Iype T., Francis J., Garmey J.C., et al.: Mechanism of insulin gene regulation by the pancreatic transcription factor Pdx-1: application of pre-mRNA analysis and chromatin immunoprecipitation to assess formation of functional transcriptional complexes. *J Biol Chem* 280:16798-16807, 2005
- [26] Mosley A.L., Ozcan S.: The pancreatic duodenal homeobox-1 protein (Pdx-1) interacts with histone deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on low levels of glucose. *J Biol Chem* 279:54241-54247, 2004
- [27] Francis J., Chakrabarti S.K., Garmey J.C., Mirmira R.G.: Pdx-1 links histone H3-Lys-4 methylation to RNA polymerase II elongation during activation of insulin transcription. *J Biol Chem* 280:36244-36253, 2005

- [28] Robertson R.P., Zhang H.J., Pyzdrowski K.L., Walseth T.F.: Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *J Clin Invest* 90:320-325, 1992
- [29] Davalli A.M., Pontiroli A.E., Socci C., et al.: Human islets chronically exposed in vitro to different stimuli become unresponsive to the same stimuli given acutely: evidence supporting specific desensitization rather than beta-cell exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab* 74:790-794, 1992
- [30] Marshak S., Leibowitz G., Bertuzzi F., et al.: Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes* 48:1230-1236, 1999
- [31] Olson L.K., Sharma A., Peshavaria M., et al.: Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9127-9131, 1995
- [32] Sharma A., Olson L.K., Robertson R.P., Stein R.: The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression. *Mol Endocrinol* 9:1127-1134, 1995
- [33] Marshak S., Benshushan E., Shoshkes M., et al.: Functional conservation of regulatory elements in the pdx-1 gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol* 20:7583-7590, 2000
- [34] Kitamura Y.I., Kitamura T., Kruse J.P., et al.: FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab* 2:153-163, 2005
- [35] Harmon J.S., Stein R., Robertson R.P.: Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells. *J Biol Chem* 280:11107-11113, 2005
- [36] Lu M., Seufert J., Habener J.F.: Pancreatic beta-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/enhancer-binding protein beta. Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47. *J Biol Chem* 272:28349-28359, 1997
- [37] Seufert J., Weir G.C., Habener J.F.: Differential expression of the insulin gene transcriptional repressor CCAAT/enhancer-binding protein beta and transactivator islet duodenum homeobox-1 in rat pancreatic beta cells during the development of diabetes mellitus. *J Clin Invest* 101:2528-2539, 1998
- [38] Lawrence M.C., McGlynn K., Park B.H., Cobb M.H.: ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter. *J Biol Chem* 280:26751-26759, 2005
- [39] Jonas J.C., Laybutt D.R., Steil G.M., et al.: High glucose stimulates early response gene c-Myc expression in rat pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 276:35375-35381, 2001

- [40] Kaneto H., Sharma A., Suzuma K., et al.: Induction of c-Myc expression suppresses insulin gene transcription by inhibiting NeuroD/BETA2-mediated transcriptional activation. *J Biol Chem* 277:12998-13006, 2002
- [41] Koya D., King G.L.: Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47:859-866, 1998
- [42] Finkel T., Holbrook N.J.: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247, 2000
- [43] Purves T., Middlemas A., Agthong S., et al.: A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *Faseb J* 15:2508-2514, 2001
- [44] Liu W., Schoenkerman A., Lowe W.L., Jr.: Activation of members of the mitogen-activated protein kinase family by glucose in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E782-790, 2000
- [45] Naito Z., Takashi E., Xu G., et al.: Different influences of hyperglycemic duration on phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 in rat heart. *Exp Mol Pathol* 74:23-32, 2003
- [46] Lawrence M., Shao C., Duan L., McGlynn K., Cobb M.H.: The protein kinases ERK1/2 and their roles in pancreatic beta cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192:11-17, 2008
- [47] Unger R.H.: Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44:863-870, 1995
- [48] Briaud I., Harmon J.S., Kelpe C.L., Segu V.B., Poitout V.: Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes* 50:315-321, 2001
- [49] Kelpe C.L., Johnson L.M., Poitout V.: Increasing triglyceride synthesis inhibits glucose-induced insulin secretion in isolated rat islets of langerhans: a study using adenoviral expression of diacylglycerol acyltransferase. *Endocrinology* 143:3326-3332, 2002
- [50] Moore P.C., Ugas M.A., Hagman D.K., Parazzoli S.D., Poitout V.: Evidence against the involvement of oxidative stress in fatty acid inhibition of insulin secretion. *Diabetes* 53:2610-2616, 2004
- [51] Xiao J., Gregersen S., Pedersen S.B., Hermansen K.: Differential impact of acute and chronic lipotoxicity on gene expression in INS-1 cells. *Metabolism* 51:155-162, 2002
- [52] Grodsky G.M., Batts A.A., Bennett L.L., et al.: Effects of Carbohydrates on Secretion of Insulin from Isolated Rat Pancreas. *Am J Physiol* 205:638-644, 1963
- [53] Coore H.G., Randle P.J.: Inhibition of glucose phosphorylation by mannoheptulose. *Biochem J* 91:56-59, 1964
- [54] Li G.D., Milani D., Dunne M.J., et al.: Extracellular ATP causes Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent and -independent insulin secretion in RINm5F cells. Phospholipase C mediates Ca<sup>2+</sup> mobilization but not Ca<sup>2+</sup> influx and membrane depolarization. *J Biol Chem* 266:3449-3457, 1991



- [55] Chen C., Hosokawa H., Bumbalo L.M., Leahy J.L.: Regulatory effects of glucose on the catalytic activity and cellular content of glucokinase in the pancreatic beta cell. Study using cultured rat islets. *J Clin Invest* 94:1616-1620, 1994
- [56] Liu Y.Q., Jetton T.L., Leahy J.L.: beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *J Biol Chem* 277:39163-39168, 2002
- [57] Roche E., Farfari S., Witters L.A., et al.: Long-term exposure of beta-INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression. *Diabetes* 47:1086-1094, 1998
- [58] Brock B., Mogensen J.H., Gregersen S., Hermansen K.: Glucose desensitization in INS-1 cells: evidence of impaired function caused by glucose metabolite(s) rather than by the glucose molecule per se. *Metabolism* 51:671-677, 2002
- [59] Tiedge M., Lortz S., Drinkgern J., Lenzen S.: Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46:1733-1742, 1997
- [60] Tang C., Han P., Oprescu A.I., et al.: Evidence for a role of superoxide generation in glucose-induced beta-cell dysfunction in vivo. *Diabetes* 56:2722-2731, 2007
- [61] Brownlee M.: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820, 2001
- [62] Brownlee M.: The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54:1615-1625, 2005
- [63] Robertson R.P.: Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279:42351-42354, 2004
- [64] Coore H.G., Randle P.J.: Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro. *Biochem J* 93:66-78, 1964
- [65] Lisec J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L., Fernie A.R.: Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* 1:387-396, 2006
- [66] Gazdar A.F., Chick W.L., Oie H.K., et al.: Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:3519-3523, 1980
- [67] Santerre R.F., Cook R.A., Crisel R.M., et al.: Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4339-4343, 1981
- [68] Efrat S., Linde S., Kofod H., et al.: Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9037-9041, 1988

- [69] Ishihara H., Asano T., Tsukuda K., et al.: Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 36:1139-1145, 1993
- [70] Asfari M., Janjic D., Meda P., et al.: Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130:167-178, 1992
- [71] Praz G.A., Halban P.A., Wollheim C.B., et al.: Regulation of immunoreactive-insulin release from a rat cell line (RINm5F). *Biochem J* 210:345-352, 1983
- [72] McClenaghan N.H., Flatt P.R.: Engineering cultured insulin-secreting pancreatic B-cell lines. *J Mol Med* 77:235-243, 1999
- [73] Rabuazzo A.M., Buscema M., Vinci C., et al.: Inhibition of the high-affinity glucose transporter GLUT 1 affects the sensitivity to glucose in a hamster-derived pancreatic beta cell line (HIT). *Diabetologia* 36:1204-1207, 1993
- [74] Goodacre R., Vaidyanathan S., Dunn W.B., Harrigan G.G., Kell D.B.: Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol* 22:245-252, 2004
- [75] Raamsdonk L.M., Teusink B., Broadhurst D., et al.: A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* 19:45-50, 2001
- [76] Fiehn O., Kopka J., Dormann P., et al.: Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol* 18:1157-1161, 2000
- [77] Stitt M., Fernie A.R.: From measurements of metabolites to metabolomics: an 'on the fly' perspective illustrated by recent studies of carbon-nitrogen interactions. *Curr Opin Biotechnol* 14:136-144, 2003
- [78] Parr C.W.: Inhibition of phosphoglucose isomerase. *Nature* 178:1401, 1956
- [79] Kahana S.E., Lowry O.H., Schulz D.W., Passonneau J.V., Crawford E.J.: The kinetics of phosphoglucoisomerase. *J Biol Chem* 235:2178-2184, 1960
- [80] Kolbe H., Keller K., Lange K., Herken H.: Glucose metabolism in C-1300 neuroblastoma cells after inhibition of hexose monophosphate pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 296:123-130, 1977
- [81] Aramata S., Han S.I., Yasuda K., Kataoka K.: Synergistic activation of the insulin gene promoter by the beta-cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1. *Biochim Biophys Acta* 1730:41-46, 2005
- [82] Ashery-Padan R., Zhou X., Marquardt T., et al.: Conditional inactivation of Pax6 in the pancreas causes early onset of diabetes. *Dev Biol* 269:479-488, 2004
- [83] Sander M., Sussel L., Connors J., et al.: Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 127:5533-5540, 2000

- [84] Halestrap A.P. und Price N.T.: The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343:281-299,1999
- [85] MacDonald M.J., Fahien L.A., Buss J.D., et al.: Citrate oscillates in liver and pancreatic beta cell mitochondria and in INS-1 insulinoma cells. *J Biol Chem* 278:51894-51900, 2003
- [86] Sjöholm A., Lehtihet M., Efanov A.M., et al.: Glucose metabolites inhibit protein phosphatases and directly promote insulin exocytosis in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 143:4592-4598, 2002
- [87] Van Schaftingen E., Dethieux M., Veiga da Cunha M.: Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *Faseb J* 8:414-419, 1994
- [88] Colowick S.P.: The hexokinases. In *The enzymes*, 3rd Ed ed. Boyer P.D., Ed. New York, Academic Press, 1973, p. pp. 1-48
- [89] Christopherson R.I., Jones M.E.: The effects of pH and inhibitors upon the catalytic activity of the dihydroorotase of multienzymatic protein pyr1-3 from mouse Ehrlich ascites carcinoma. *J Biol Chem* 255:3358-3370, 1980
- [90] Bresnick E., Blatchford K.: Studies on Dihydroorotase Activity in Preparations from Novikoff Ascites Hepatoma Cells. *Arch Biochem Biophys* 104:381-386, 1964
- [91] Kennedy J.: Dihydroorotase from rat liver: purification, properties and regulatory role in pyrimidine biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 160:358-365, 1974
- [92] Okada Y., Taniguchi H., Schimada C.: High concentration of GABA and high glutamate decarboxylase activity in rat pancreatic islets and human insulinoma. *Science* 194:620-622, 1976
- [93] Braun M., Wendt A., Buschard K., et al.: GABAB receptor activation inhibits exocytosis in rat pancreatic beta-cells by G-protein-dependent activation of calcineurin. *J Physiol Metab* 290:E494-499, 2004
- [94] Chessler S.D., Lernmark A.: The role of glutamic acid decarboxylase and GABA in the pancreas and diabetes. In *GABA in the Nervous System: The View at Fifty Years* Olson D.M.R., Ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. pp 471-484
- [95] Wang C., Kerckhofs K., Van de Casteele M., et al.: Glucose inhibits GABA release by pancreatic beta-cells through an increase in GABA shunt activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E494-499, 2006
- [96] Ligon B., Yang J., Morin S.B., Ruberti M.F., Steer M.L.: Regulation of pancreatic islet cell survival and replication by gamma-aminobutyric acid. *Diabetologia* 50:764-773, 2007
- [97] Shinozuka Y., Okada M., Oki T., et al.: Altered expression of HES-1, BETA2/NeuroD, and PDX-1 is involved in impaired insulin synthesis induced by glucocorticoids in HIT-T15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 287:229-235, 2001
- [98] Olson L.K., Redmon J.B., Towle H.C., Robertson R.P.: Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J Clin Invest* 92:514-519, 1993

- [99] Poitout V., Olson L.K., Robertson R.P.: Chronic exposure of betaTC-6 cells to supraphysiologic concentrations of glucose decreases binding of the RIPE3b1 insulin gene transcription activator. *J Clin Invest* 97:1041-1046, 1996
- [100] Zhao L., Guo M., Matsuoka T.A., et al.: The islet beta cell-enriched MafA activator is a key regulator of insulin gene transcription. *J Biol Chem* 280:11887-11894, 2005
- [101] Kaneto H., Matsuoka T.A., Nakatani Y., et al.: A crucial role of MafA as a novel therapeutic target for diabetes. *J Biol Chem* 280:15047-15052, 2005
- [102] Docherty H.M., Hay C.W., Ferguson L.A., et al.: Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter. *Biochem J* 389:813-820, 2005
- [103] Kawamori D., Kajimoto Y., Kaneto H., et al.: Oxidative stress induces nucleocytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor PDX-1 through activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Diabetes* 52:2896-2904, 2003
- [104] Ubeda M., Rukstalis J.M., Habener J.F.: Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 activity protects pancreatic beta cells from glucotoxicity. *J Biol Chem* 281:28858-28864, 2006
- [105] Tanaka Y., Tran P.O., Harmon J., Robertson R.P.: A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12363-12368, 2002
- [106] Matsuoka T., Kajimoto Y., Watada H., et al.: Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *J Clin Invest* 99:144-150, 1997
- [107] Kaneto H., Fujii J., Myint T., et al.: Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J* 320 ( Pt 3):855-863, 1996
- [108] Srinivasan S., Bernal-Mizrachi E., Ohsugi M., Permutt M.A.: Glucose promotes pancreatic islet beta-cell survival through a PI 3-kinase/Akt-signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E784-793, 2002
- [109] Schuppin G.T., Bonner-Weir S., Montana E., Kaiser N., Weir G.C.: Replication of adult pancreatic-beta cells cultured on bovine corneal endothelial cell extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A:339-344, 1993
- [110] 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. *Diabetes* 38:49-53, 1989
- [111] Hoorens A., Van de Casteele M., Kloppel G., Pipeleers D.: Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. *J Clin Invest* 98:1568-1574, 1996
- [112] Piro S., Anello M., Di Pietro C., et al.: Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress. *Metabolism* 51:1340-1347, 2002

- [113] Efanova I.B., Zaitsev S.V., Zhivotovsky B., et al.: Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. A process dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Biol Chem* 273:33501-33507, 1998
- [114] Maedler K., Spinas G.A., Lehmann R., et al.: Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 50:1683-1690, 2001
- [115] Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Harris A.L., Sivridis E.: Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res* 66:632-637, 2006
- [116] Warburg O.: On the origin of cancer cells. *Science* 123:309-314, 1956
- [117] Path G., Opel A., Knoll A., Seufert J.: Nuclear protein p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth. *Diabetes* 53 Suppl 1:S82-85, 2004
- [118] Mallo G.V., Fiedler F., Calvo E.L., et al.: Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth. *J Biol Chem* 272:32360-32369, 1997
- [119] Vasseur S., Vidal Mallo G., Fiedler F., et al.: Cloning and expression of the human p8, a nuclear protein with mitogenic activity. *Eur J Biochem* 259:670-675, 1999
- [120] Okumura M., Yamamoto M., Sakuma H., et al.: Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: reciprocal involvement of PKC-alpha and PPAR expression. *Biochim Biophys Acta* 1592:107-116, 2002
- [121] Frodin M., Sekine N., Roche E., et al.: Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1. *J Biol Chem* 270:7882-7889, 1995
- [122] Khoo S., Cobb M.H.: Activation of mitogen-activating protein kinase by glucose is not required for insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5599-5604, 1997
- [123] Haefliger J.A., Tawadros T., Meylan L., et al.: The scaffold protein IB1/JIP-1 is a critical mediator of cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells. *J Cell Sci* 116:1463-1469, 2003
- [124] Storling J., Binzer J., Andersson A.K., et al.: Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt. *Diabetologia* 48:2039-2050, 2005
- [125] Storling J., Zaitsev S.V., Kapelioukh I.L., et al.: Calcium has a permissive role in interleukin-1beta-induced c-jun N-terminal kinase activation in insulin-secreting cells. *Endocrinology* 146:3026-3036, 2005
- [126] Khoo S., Griffen S.C., Xia Y., et al.: Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 278:32969-32977, 2003

- [127] Benkhelifa S., Provot S., Nabais E., et al.: Phosphorylation of MafA is essential for its transcriptional and biological properties. *Mol Cell Biol* 21:4441-4452, 2001
- [128] Hanlon M., Sturgill T.W., Sealy L.: ERK2- and p90(Rsk2)-dependent pathways regulate the CCAAT/enhancer-binding protein-beta interaction with serum response factor. *J Biol Chem* 276:38449-38456, 2001
- [129] Piwien Pilipuk G., Galigniana M.D., Schwartz J.: Subnuclear localization of C/EBP beta is regulated by growth hormone and dependent on MAPK. *J Biol Chem* 278:35668-35677, 2003
- [130] Matschinsky F.M., Ellerman J.E.: Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *J Biol Chem* 243:2730-2736, 1968
- [131] Matschinsky F.M., Kauffman F.C., Ellerman J.E.: Effect of hyperglycemia on the hexose monophosphate shunt in islets of Langerhans. *Diabetes* 17:475-480, 1968
- [132] Jarrett R.J., Keen H., Track N.: Glucose and RNA synthesis in mammalian islets of Langerhans. *Nature* 213:634-635, 1967
- [133] Lazarow A.: Functional Characterization and Metabolic Pathways of the Pancreatic Islet Tissue. *Recent Prog Horm Res* 19:489-546, 1963
- [134] Ammon H.P., Steinke J.: Effect of 6-aminonicotinamide on insulin release and C-14 glucose oxidation by isolated pancreatic rat islets: difference between glucose, tolbutamide and aminophylline. *Endocrinology* 91:33-38, 1972
- [135] Santen R.J., Song R.X., McPherson R., et al.: The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80:239-256, 2002
- [136] Seru R., Mondola P., Damiano S., et al.: HaRas activates the NADPH oxidase complex in human neuroblastoma cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *J Neurochem* 91:613-622, 2004
- [137] Zhao C., Wilson M.C., Schuit F., Halestrap A.P., Rutter G.A.: Expression and Distribution of Lactate/Monocarboxylate Transporter Isoforms in Pancreatic Islets and the Exocrine Pancreas. *Diabetes* 50:361-366, 2001
- [138] Haworth R.S., Dashnyam S., Avkiran M.: Ras triggers acidosis-induced activation of the extracellular-signal-regulated kinase pathway in cardiac myocytes. *Biochem J* 399:493-501, 2006
- [139] Bernard F., Vanhoutte P., Bennisroune A., et al.: pH is an intracellular effector controlling differentiation of oligodendrocyte precursors in culture via activation of the ERK1/2 pathway. *J Neurosci Res* 84:1392-1401, 2006
- [140] Oliver R., 3rd, Friday E., Turturro F., Lacy A., Welbourne T.: Troglitazone's rapid and sustained activation of ERK1/2 induces cellular acidosis in LLC-PK1-F+ cells: physiological responses. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F1257-1266, 2005
- [141] Fan Z., Tokuyama Y., Makielski J.C.: Modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by internal acidification in insulin-secreting cells. *Am J Physiol* 267:C1036-1044, 1994

- [142] Koyano T., Kakei M., Nakashima H., et al.: ATP-regulated K<sup>+</sup> channels are modulated by intracellular H<sup>+</sup> in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 463:747-766, 1993
- [143] Xu H., Wu J., Cui N., et al.: Distinct histidine residues control the acid-induced activation and inhibition of the cloned K(ATP) channel. *J Biol Chem* 276:38690-38696, 2001
- [144] Xu H., Cui N., Yang Z., et al.: Direct activation of cloned K(atp) channels by intracellular acidosis. *J Biol Chem* 276:12898-12902, 2001
- [145] Piao H., Cui N., Xu H., et al.: Requirement of multiple protein domains and residues for gating K(ATP) channels by intracellular pH. *J Biol Chem* 276:36673-36680, 2001
- [146] Wu J., Cui N., Piao H., et al.: Allosteric modulation of the mouse Kir6.2 channel by intracellular H<sup>+</sup> and ATP. *J Physiol* 543:495-504, 2002

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die auf unterschiedlichste Art und Weise das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht und mich in dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Allen voran danke ich meinem Betreuer Prof. Dr. Joachim Spranger und dem Leiter der Abteilung Klinische Ernährung Prof. Dr. Andreas Pfeiffer für das interessante Thema, die super Arbeitsbedingungen sowie für die kritischen Hinweise und Anregungen bei der Erstellung der Arbeit. Darüber hinaus danke ich beiden für das in mich gesetzte Vertrauen und die Gelegenheit gehabt zu haben eigene Vorstellungen zu verfolgen.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Abteilung "Klinische Ernährung" möchte ich für die sehr angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit danken. Ein besonderer Dank gilt dabei Nadine, für die jederzeit tatkräftige Hilfe bei den experimentellen Arbeiten. Außerdem danke ich Dr. Martin Osterhoff, der immer wieder bei technischen, experimentellen und Software-bedingten Problemen seine Hilfe angeboten hat. Ich danke außerdem Änne Eckardt vom Max Planck Institut für Pflanzenphysiologie in Golm für die selbstverständliche Messung der vielen Proben mittels Gaschromatographie. Bei den Doktoranden, PostDocs, Diplomanden und Praktikanten unserer Abteilung, die mich während der letzten Jahre begleitet haben, genauer gesagt bei: Uta, Antje, Rita, Doreen, Susanne, Angela, Özlem, Olga, Katrin, Melanie, Jelena, Anne, Lysann, Susi, Conny und Anke möchte ich mich für die schöne, lustige und sportlich aktive Zeit während und außerhalb der Arbeit bedanken.

Meiner Freundin Kathleen möchte ich für ein ständig offenes Ohr und die vielen Ermutigungen in schwierigen Phasen danken.

Schließlich danke ich meiner Familie für die stetige Förderung meiner Ausbildung und für ein immer wieder mehr als herzliches Willkommen in Thüringen.

Ich möchte diese Arbeit meinem Freund Gareth widmen, der mir mit viel viel Geduld (und davon hat er nur wenig) bei der Metabolitenanalyse und der Datenverarbeitung geholfen hat. Danke dass du so viel Verständnis für meine Launen hattest und dass du mich immer wieder auf bessere Gedanken gebracht hast.



## **Erklärung**

„Ich, Isabel Göhring, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: [Charakterisierung pankreatischer INS-1 Insulinoma-Zellen unter chronisch hoher Glukosekonzentration als Modell für Glukosetoxizität] selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

26. Juni 2008

Isabel Göhring

## **Lebenslauf**

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mitveröffentlicht.“