

Aus der Klinik für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Bedeutung der Protein Kinase C Isoformen PKC α
und PKC β für das Acetylcholin-induzierte Calcium-
Signal in den pankreatischen β -Zellen der Maus**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Roman Iakoubov

aus Moskau

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Chr. Schöfl
2. Prof. Dr. J. Köhrle
3. Prof. Dr. I. Rustenbeck

Datum der Promotion: 23.03.2007

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	4
1. Einführung	7
1.1 Insulinsynthese als Vorstufe der gesteuerten Insulinsekretion	7
1.2 Ca^{2+} als intrazellulärer Botenstoff („second messenger“) in der β -Zelle ...	9
1.3 Insulinsekretion durch die β -Zellen	10
1.3.1 Glukosevermittelter Ca^{2+} -Anstieg und Insulinsekretion	11
1.3.2 Inkretin-vermittelter Ca^{2+} -Anstieg und Insulinsekretion	12
1.3.3 ACh-vermittelter Ca^{2+} -Anstieg und Insulinsekretion	13
1.4 Funktionelle Aspekte der PKC-Familie in der β -Zelle	16
1.5 Die Interaktion zwischen PKC und dem ACh-vermittelten Ca^{2+} -Anstieg	19
1.6 Fragestellung	22
2. Materialien und Methoden	24
2.1 cPKC-Knockout im Maus-Modell	24
2.2 Isolation der primären pankreatischen β -Zellen der Maus	25
2.3 Das Anwendungsprinzip von Fluoreszenzfarbstoffen zur Bestimmung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration in der Zelle	27
2.4 Messung der Ca^{2+} -Konzentration	28
2.5 Materialien	30
2.6 Statistik	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration der β -Zellen	32
3.2 Einfluss der PKC α -Defizienz auf das ACh-induzierte Ca^{2+} -Signal	33
3.2.1 ACh-Stimulation der PKC α -/- β -Zellen	33
3.2.2 ACh-Stimulation der β -Zellen im Ca^{2+} -freien Medium	34
3.2.3 Ca^{2+} -Einstrom über VDCC in PKC α -/- β -Zellen	35
3.2.4 Ca^{2+} -Einstrom über VICC in PKC α -/- β -Zellen	36
3.2.5 Tabellarische Zusammenfassung der Veränderungen vom Ca^{2+} -Signal in PKC α -/- β -Zellen	39
3.3 Einfluss der PKC β -Defizienz auf das ACh-bedingte Ca^{2+} -Signal	40
3.3.1 ACh-Stimulation der PKC β -/- β -Zellen	40
3.3.2 ACh-bedingte Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher	41
3.3.3 Ca^{2+} -Einstrom über VDCC in PKC β -/- β -Zellen	42

3.3.4	Ca ²⁺ -Einstrom über VICC in PKCβ ^{-/-} β-Zellen	43
3.3.5	Tabellarische Zusammenfassung der Veränderungen vom Ca ²⁺ -Signal in PKCβ ^{-/-} β-Zellen	46
3.4	Einfluss der kombinierten PKCαβ ^{-/-} Defizienz auf das ACh-bedingte Ca ²⁺ -Signal	47
3.4.1	ACh-Stimulation der PKCαβ ^{-/-} β-Zellen	47
3.4.2	Ca ²⁺ -Einstrom über VDCC in PKCαβ ^{-/-} β-Zellen	49
3.4.3	Ca ²⁺ -Einstrom über VICC in PKCαβ ^{-/-} β-Zellen	50
3.4.4	Tabellarische Zusammenfassung der Veränderungen vom Ca ²⁺ -Signal in PKCαβ ^{-/-} β-Zellen	51
4	Diskussion	52
4.1	Beteiligung des PKCα-Isozymes am ACh-induzierten [Ca ²⁺] _i -Signal	52
4.2	Beteiligung des PKCβ-Isozymes am ACh-induzierten [Ca ²⁺] _i -Signal	57
4.3	Wirkung der kombinierten cPKC-Defizienz auf das ACh-induzierte [Ca ²⁺] _i -Signal	59
4.4	Zusammenfassung	61
5	Literatur	63
6	Veröffentlichungen	80
7	Eidesstattliche Erklärung	82
8	Lebenslauf	83

Abkürzungen:

AC	Adenylatcyclase
ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
aPKC	atypische PKC Isoformen
AUC	area under the curve
AVP	Arginin-Vasopressin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin (Rinderserum-Albumin)
[Ca²⁺]_i	intrazelluläre freie Calciumkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosin 3',5'-Monophosphat
cAMP-GEFII	cAMP-regulated guanine nucleotid exchange factor II
CaR	Ca ²⁺ -sensing Rezeptor
Ca_v	Spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle
CCh	Carbachol
cPKC	klassische PKC Isoformen
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-Aminoethylether)-N,N,N,N,-Tetraessigsäure
ES	embryonische Stammzellen
FBS	fetal bovine serum (fetales Kälber-Serum)
Fura-2/AM	1-[2-(5-Carboxoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methyl-phenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraessigsäure Pentaacetoxymethyl-Ester
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
GLUT2	Glukosetransporter 2

GRP	gastrin-releasing peptide (auch: Bombesin)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N-2-Ethansulfonsäure
IP₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
MARCKS	Myristoyliertes Alanin-reiches PKC Substrat
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n	Stichprobenumfang
n.s.	nicht signifikant
nPKC	neuartige (novel) PKC Isoformen
Nfd	Nifedipin
NO	Stickstoffmonoxid
PACAP	Pituitary Adenylatcyclase Activating-Polypeptide
PDBu	Phorbol-12,13-Dibutyrat
PIP₂	Phosphatidylinositol-1,2-Bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKCα-/-	PKC α -Defizienz
PKCβ-/-	PKC β Defizienz
PKC$\alpha\beta$-/-	kombinierte PKC α -/PKC β -Defizienz
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PS	Phosphatidylserine
RPMI-1640	Zellkultur-Medium
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RIP1	rat insulin I gene promoter
SE	Standardfehler
SUR	Sulfonylharnstoff-Rezeptor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
Tpg	Thapsigargin
TRPC	Pool-abhängige Ca ²⁺ -Kanäle

VDCC	spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle
VICC	spannungsunabhängige Ca ²⁺ -Kanäle
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
wt	Kontrolltiere mit normaler PKC-Expression (wildtyp)

6. Veröffentlichungen

Poster und Vorträge:

1. **Schöfl C., Remizov O., Iakoubov R., Brabant G. & Rustenbeck I. (2002) Regulation of the cytosolic free calcium concentration and insulin secretion by palmitate in pancreatic beta-cells.**
38th Annual Meeting of EASD, Budapest, September 2002
2. **Schöfl C., Iakoubov R. & Leitges M. (2003) Acetylcholine-induced Ca²⁺-signaling and insulin secretion in pancreatic beta-cells derived from protein kinase C β knockout mice.**
47. Symposium Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie Köln, März 2003
3. **Iakoubov R., Leitges M. & Schöfl C. (2003) Acetylcholin-stimulierte Ca²⁺-Signale und Insulinsekretion in Proteinkinase C β -defizienten Beta-Zellen.**
38. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Bremen, Mai 2003
4. **Schöfl C., Iakoubov R. & Leitges M. (2004) Acetylcholine-induced Ca²⁺ signaling in pancreatic beta-cells derived from protein kinase C α deficient mice.**
48. Symposium Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie Dresden, März 2004
5. **Iakoubov R., Leitges M. & Schöfl C. (2004) ACh-stimulierte Ca²⁺-Signale in Proteinkinase C α -defizienten Beta-Zellen.**
39. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, Hannover, Mai 2004
6. **Iakoubov R., Whiteside C. & Brubaker PL. (2004) Protein kinase C ζ activation and translocation are required for fatty-acid induced secretion of GLP-1 in intestinal endocrine L-cells**
40th Annual Meeting of EASD, München, September 2004

7. **Iakoubov R., Schnell S., Rustenbeck I., Leitges M. & Schöfl C. (2005) Acetylcholine-induced Ca^{2+} signaling and insulin secretion from pancreatic beta-cells: distinct roles for protein kinase C β**
87th Annual Meeting of the Endocrine Society, San Diego, Juni 2005

Veröffentlichungen:

1. **Remizov, O., Iakoubov, R., Dufer, M., Krippeit Drews, P., Drews, G., Waring, M., Brabant, G., Wienbergen, A., Rustenbeck, I. & Schöfl, C. (2003) Palmitate-induced Ca^{2+} -signaling in pancreatic beta-cells. *Mol Cell Endocrinol*, 212, 1-9.**
2. **Schaefer, M., Mischak, H., Schnell, S., Griese, A., Iakoubov, R., Riepenhausen, G. and Schöfl, C. (2004) Mechanisms of arginine-vasopressin-induced Ca^{2+} oscillations in beta-cells (HIT-T15): a role for oscillating protein kinase C. *Endocrinology*, 145, 4635-4644.**

weitere Publikationen in Vorbereitung

7. Eidesstattliche Erklärung

**Ich, Roman Iakoubov, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte
Dissertationsschrift mit dem Thema**

**„Die Bedeutung der Protein Kinase C Isoformen PKC α und PKC β für
das Acetylcholin-induzierte Calcium-Signal in den pankreatischen β -
Zellen der Maus“**

**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.**

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. C. Schöfl, in dessen Abteilung meine Dissertation durchgeführt werden konnte und der mir das Thema dieser Doktorarbeit stellte und mich durch seine gute und kontinuierliche Betreuung unterstützte.

Mein Dank gilt auch Frau Gabriele Riepenhausen, der MTA unserer Forschungsgruppe, die mich bei der Durchführung der Experimente unterstützte und anleitete.

Mein Dank gilt Frau Lina Lauffer, die mir zahlreiche stilistische Hinweise gab.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern, die meine Arbeit kritisch begleiteten und ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht möglich wäre.