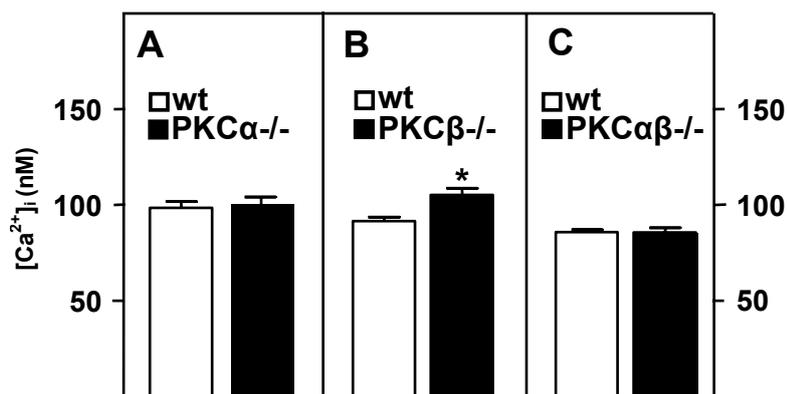


### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Basale $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration der $\beta$ -Zellen

Die  $\beta$ -Zellen in Ruhe zeigen in Gegenwart von 5 mM Glukose  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration von ca. 100 nM in unterschiedlichen Spezies (Berridge et al., 2000; Prentki and Wollheim, 1984; Schöfl et al., 1995).

Bei den  $\beta$ -Zellen vom Mausstamm 129S/Sv mit normal erhaltener PKC $\alpha$ -Expression lag die  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration bei  $98.9 \pm 2.9$  nM (n=66). Bei den PKC $\alpha$ -/- Zellen lag die basale  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration der einzelnen  $\beta$ -Zellen im Gegenwart von 5 mM Glukose bei  $101.2 \pm 3.0$  nM (n=75). Hierbei bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (**Abb 3.1A**).



**Abb. 3.1.** Wirkung von PKC-Defizienz auf die basale  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration in  $\beta$ -Zellen, Mittelwerte  $\pm$  SEM; **A:** Basale  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration in PKC $\alpha$ -/-  $\beta$ -Zellen vs. Kontrollgruppe; p=n.s. **B:** Basale  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration signifikant erhöht in PKC $\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen gegenüber der Kontrollgruppe; p=n.s. **C:** Basale  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration in PKC $\alpha\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen vs. Kontrollgruppe; p=n.s.

Die  $\beta$ -Zellen vom Mausstamm C57/BI-6, welche als Kontrolle für die PKC $\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen verwendet wurden, zeigen eine  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration von  $92 \pm 1.6$  nM (n=79). Bei den PKC $\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen war das basale  $Ca^{2+}$ -Signal höher ( $105.9 \pm 2.9$  nM, n=79; p<0.05) (**Abb. 3.1B**).

Die  $\beta$ -Zellen des 129Sv/BI-6 Hybridstammes mit vorhandener PKC $\alpha$ -/PKC $\beta$ -Expression zeigten eine basale  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration von  $85.7 \pm 1.3$  nM (n=61). Die basale  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration bei den PKC $\alpha\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen betrug

im Gegenwart von 5 mM Glukose  $85.5 \pm 2.5$  nM (n=57) und war damit nicht signifikant unterschiedlich gegenüber den Kontrollen (**Abb. 3.1C**).

### **3.2 Einfluss der PKC $\alpha$ -Defizienz auf das ACh-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Signal**

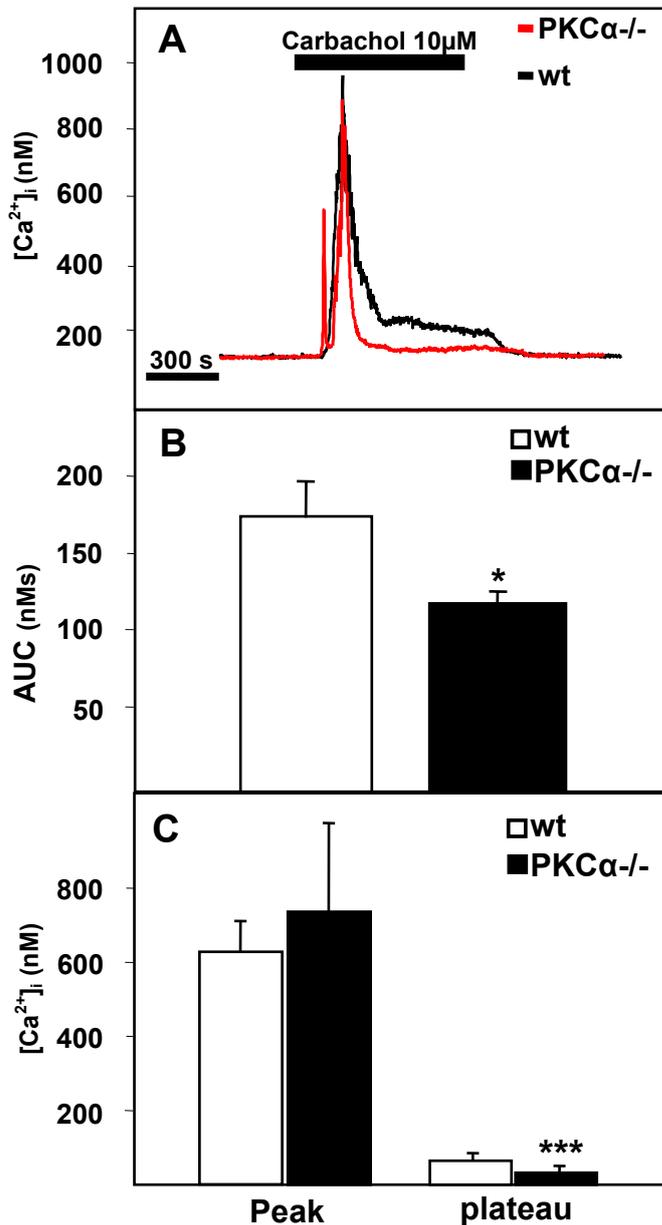
#### **3.2.1 ACh-Stimulation der PKC $\alpha$ -/- $\beta$ -Zellen**

Zur Aktivierung der muskarinischen Rezeptoren an der Membran der  $\beta$ -Zelle wurde in dieser Arbeit Carbachol (CCh) als Analogon des parasymphatischen Transmitters ACh verwendet. Wie in **Kapitel 1.3.3** dargestellt, verursacht die Stimulation mit Carbachol die G-Protein-vermittelte PLC-Aktivierung und damit den Abbau von PIP<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub> und DAG. Es kommt zu einer DAG-vermittelten PKC-Aktivierung und einer Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Konzentration. Es handelt sich dabei um eine biphasische Veränderung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Konzentration, bestehend aus einem transienten Peak, gefolgt von einer lang anhaltenden Plateau-Phase (**Abb. 3.2**).

Der initiale Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Konzentration kommt durch die Freisetzung der intrazellulär gespeicherten Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Die nachfolgende Plateau-Phase benötigt einen Einstrom der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen über VDCC und VICC (Gilon and Henquin, 2001; Schöfl et al., 2000a).

Nach der Stimulation der  $\beta$ -Zellen mit 10 $\mu$ M CCh stieg die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Konzentration gleichermaßen bei den  $\beta$ -Zellen des wildtyp- (n=14) wie auch des PKC $\alpha$ -/- Stammes (n=19) an ( $627.3 \pm 80.9$  nM vs.  $736.9 \pm 107.8$  nM; p=n.s.).

5 Minuten nach Beginn der Stimulation mit 10 $\mu$ M CCh wurde die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Konzentration erneut gemessen und als Plateau-Phase ausgewertet. Das Plateau war bei den PKC $\alpha$ -/-  $\beta$ -Zellen signifikant niedriger ( $65.3 \pm 8.1$  nM vs.  $32.4 \pm 14.3$  nM; p<0.01). Auch der AUC-Wert war bei den PKC $\alpha$ -/-  $\beta$ -Zellen signifikant erniedrigt ( $173.6 \pm 86.3$  nMs vs.  $115.4 \pm 9.5$  nMs; p<0.05). In weiteren Experimenten sollte die Beteiligung der intra- und extrazellulären Komponenten zur Steuerung des Ca<sup>2+</sup>-Signals bei den PKC $\alpha$ -/-  $\beta$ -Zellen untersucht werden (**Abb. 1.3**).

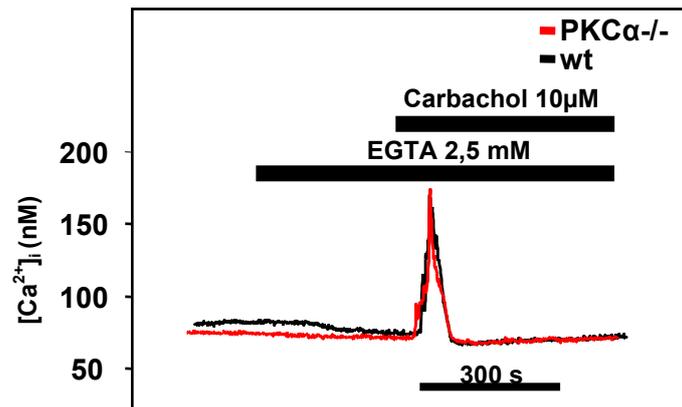


**Abb. 3.2** Wirkung von PKC $\alpha$ -Defizienz auf das CCh-induzierte Ca<sup>2+</sup>-Signal in  $\beta$ -Zellen; **A**: Repräsentative Spuren von 14-19 Experimenten; **B**: Mittelwerte  $\pm$  SEM des Ca<sup>2+</sup>-Umsatzes in der Zelle, als AUC-Wert für die unter A gezeigten Versuche; **C**: Mittelwerte  $\pm$  SEM des maximalen Anstiegs und der Plateau-Phase; \* -  $p < 0.05$ , \*\*\* -  $p < 0.01$

### 3.2.2 ACh-Stimulation der $\beta$ -Zellen im Ca<sup>2+</sup>-freien Medium

Die Stimulation der muskarinischen Rezeptoren führt sowohl zum Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über die Zellmembran als auch zur Entleerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher. Die  $\beta$ -Zellen wurden im Ca<sup>2+</sup>-freien Medium (incl. EGTA 2,5 mM) mit CCh stimuliert, um die intrazelluläre Freisetzung der Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu untersuchen. Die Stimulation mit CCh führte sowohl bei den Kontrollzellen

(n=8) wie auch bei den PKC $\alpha$ -/-  $\beta$ -Zellen (n=9) zum transienten  $[Ca^{2+}]_i$ -Aufstrich ohne Plateau ( $115.1 \pm 47.1$  nM vs.  $99.1 \pm 14$  nM; p=n.s.) (**Abb. 3.3**). Auch die AUC war in beiden Gruppen gleich ( $12.1 \pm 3.0$  nMs vs.  $15.7 \pm 3.3$  nMs; p=n.s.). Die CCh-vermittelte Freisetzung der intrazellulär gespeicherten  $Ca^{2+}$ -Ionen scheint in den PKC $\alpha$ -/-  $\beta$ -Zellen unbeeinträchtigt zu sein.



**Abb. 3.3** Wirkung von CCh auf die Entleerung intrazellulärer Speicher. Die Stimulation von  $\beta$ -Zellen mit CCh im  $Ca^{2+}$ -freien Medium führt zur vergleichbaren Reaktion bei PKC $\alpha$ -/-  $\beta$ -Zellen und Kontrollzellen. Repräsentative Spuren von 8-9 Zellen.

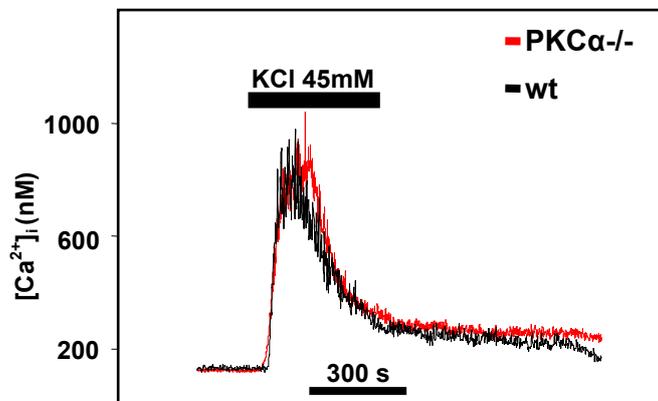
### 3.2.3 $Ca^{2+}$ -Einstrom über VDCC in PKC $\alpha$ -/- $\beta$ -Zellen

Die ACh-bedingte Entleerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher führt zum  $Ca^{2+}$ -Einstrom über VDCC und VICC.

Die VDCC können über die Stimulation der  $\beta$ -Zellen mit  $K^+$ -Ionen aktiviert werden. Die Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration im extrazellulären Medium auf 45 mM führt zur Depolarisation der Zellmembran und zur direkten rezeptorunabhängigen Aktivierung der VDCC. Es kommt zum Einstrom der  $Ca^{2+}$ -Ionen in die insulinfreisetzenden  $\beta$ -Zellen.

Die Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration in den  $\beta$ -Zellen erfolgt unmittelbar nach Zugabe des KCl mit einer transienten Erhöhung, welche schnell in eine Plateau-Phase übergeht, die über die gesamte Stimulationszeit anhält. Die Stimulation der  $\beta$ -Zellen mit KCl 45mM führte sowohl bei den Kontrollzellen (n=7) wie auch bei den PKC $\alpha$ -/-  $\beta$ -Zellen (n=10) zu einer biphasischen Veränderung mit einem Aufstrich ( $719.8 \pm 96.6$  nM vs.  $761.5 \pm 111.5$  nM;

p=n.s.) und einer Plateau-Phase ( $123.4 \pm 19.6$  nM vs.  $126.8 \pm 19.9$  nM; p=n.s.), ohne dass signifikante Unterschiede bestanden (**Abb. 3.4**). Auch der AUC-Wert blieb in beiden Gruppen gleich ( $278 \pm 41$  nMs vs.  $238.2 \pm 18.6$  nMs; p=n.s.).



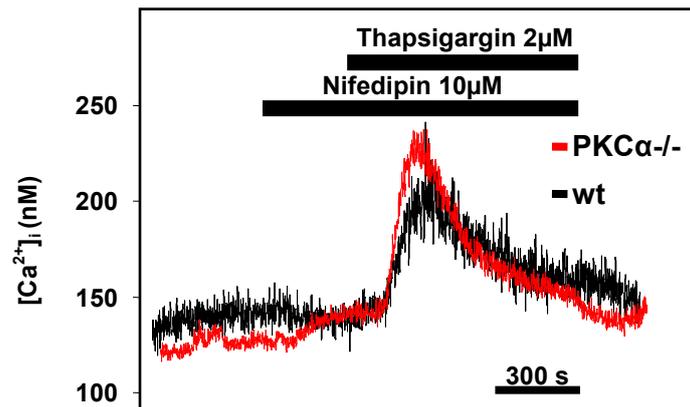
**Abb. 3.4** Wirkung der Membrandepolarisation auf  $[Ca^{2+}]_i$ . PKC $\alpha^{-/-}$   $\beta$ -Zellen zeigen keine signifikanten Veränderungen im  $Ca^{2+}$ -Signal. Repräsentative Spuren von 7-10 Experimenten.

### 3.2.4 $Ca^{2+}$ -Einstrom über VICC in PKC $\alpha^{-/-}$ $\beta$ -Zellen

Zur Beurteilung des Einstroms der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionen durch die VICC werden die  $\beta$ -Zellen mit Thapsigargin behandelt. Thapsigargin führt zur irreversiblen Blockade der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -ATPasen, die vor allem auf dem endoplasmatischen Retikulum exprimiert werden und der Wiederauffüllung der Calcium-Speicher dienen (Chen et al., 2003; Treiman et al., 1998). Aufgrund der andauernden Calcium-Verluste aus den Speichern führt die Behandlung mit zellpermeablem Thapsigargin zum Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration und dem darauf folgenden  $Ca^{2+}$ -Einstrom vor allem über die VICC. Es handelt sich hierbei um den so genannten kapazitiven  $Ca^{2+}$ -Einstrom (Putney and Bird, 1993; Takemura et al., 1989). In den  $\beta$ -Zellen führt die Entleerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher zu einem zusätzlichen  $Ca^{2+}$ -Einstrom über VDCC. Um die Beteiligung der VDCC am intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Signal auszuschließen, wurden die  $\beta$ -Zellen mit Nifedipin vorbehandelt (**Abb. 3.5**). Bei Nifedipin handelt es sich um einen spezifischen und reversiblen Inhibitor der VDCC (L-Typ).

Die Stimulation der  $\beta$ -Zellen mit Thapsigargin  $2\mu M$  (VDCC blockiert) führte sowohl bei den Kontrollzellen (n=11) als auch bei den PKC $\alpha^{-/-}$   $\beta$ -Zellen

(n=13) zu einem biphasischen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration mit einem Aufstrich ( $88.7 \pm 7.9$  nM vs.  $111.5 \pm 8.2$  nM; p=n.s.) und einer Plateau-Phase ( $45.2 \pm 3.7$  nM vs.  $49 \pm 3.6$  nM; p=n.s.). Bei der Auswertung der AUC zeigten sich keine Unterschiede ( $60.5 \pm 6.9$  nMs vs.  $58.5 \pm 5.9$  nMs; p= n.s.). Der  $Ca^{2+}$ -Einstrom über VICC scheint von der PKC $\alpha$ -Defizienz nicht betroffen zu sein.



**Abb. 3.5** Wirkung von Thapsigargin auf  $[Ca^{2+}]_i$  nach Zugabe vom VDCC-Blocker Nifedipin. Die  $\beta$ -Zellen wurden für 5 Minuten mit Nifedipin vorbehandelt und daraufhin mit Thapsigargin stimuliert. Die PKC $\alpha$ -/- Zellen zeigten keine Unterschiede im kapazitiven Einstrom. Repräsentative Spuren von 11-13 Experimenten.

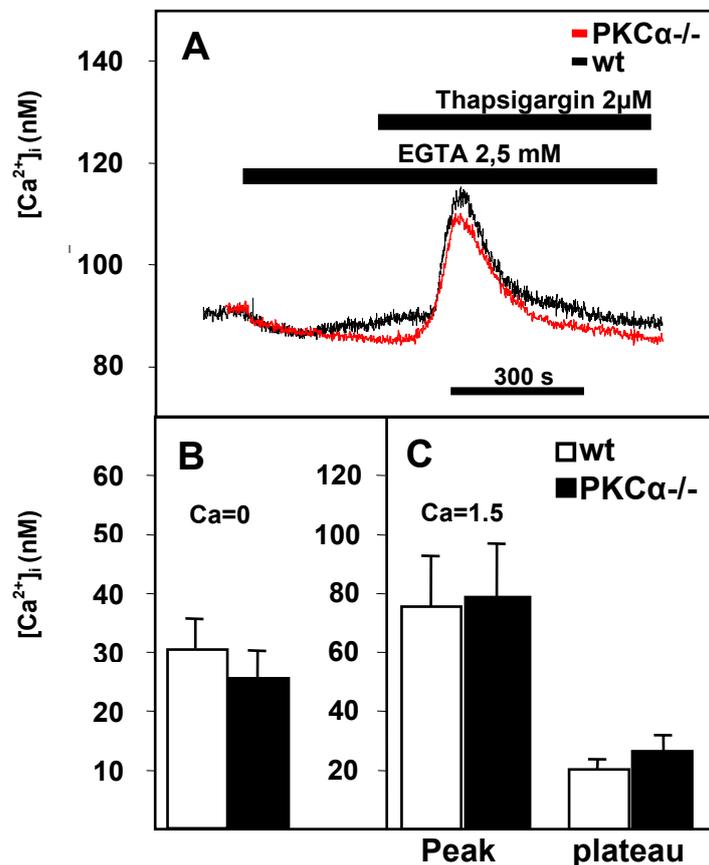
Eine weitere Möglichkeit, den kapazitiven  $Ca^{2+}$ -Einstrom nachzuweisen, besteht in der Entleerung intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Speicher im  $Ca^{2+}$ -freien Medium mit nachfolgender Zufuhr extrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Ionen. Beim Wiedereinstrom des  $Ca^{2+}$  in die  $\beta$ -Zelle handelt es sich um den kapazitiven Einstrom sowohl über die VDCC wie auch über die VICC (Schöfl et al., 1996).

In unseren Experimenten wurden die  $\beta$ -Zellen zunächst mit  $Ca^{2+}$ -freiem Medium für 5 Minuten vorbehandelt und dann mit Thapsigargin  $2\mu M$  behandelt (**Abb. 3.6**). Daraufhin kam es zum Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  ohne einer erkennbaren Plateau-Phase sowohl bei den Kontrollzellen (n=8) als auch bei den PKC $\alpha$ -/-  $\beta$ -Zellen (n=7). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ( $30.3 \pm 5$  nM vs.  $25.2 \pm 4.7$  nM). Das Aussetzen der  $\beta$ -Zellen einem  $Ca^{2+}$ -haltigen Medium führte zu einem erneuten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg mit deutlicher Aufstrich- und anhaltender

Plateau-Phase sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den PKC $\alpha$ -/-  $\beta$ -Zellen ( $75.5 \pm 17.2$  nM vs.  $78 \pm 19$  nM;  $p=n.s.$ ).

Die AUC war während beider Stimulationsphasen im calciumfreien und calciumhaltigen Medium in beiden Gruppen (Wildtyp vs. PKC $\alpha$ -/-) nicht signifikant unterschiedlich ( $\text{Ca}^{2+}$ -frei:  $22.7 \pm 4.2$  nMs vs.  $29.9 \pm 11.2$  nMs;  $\text{Ca}^{2+}$ -haltig:  $67.6 \pm 8$  nMs vs.  $65.5 \pm 9.6$  nMs;  $p=n.s.$ ) Sowohl die Funktion der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher wie auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über VDCC und VICC scheinen unter diesen Bedingungen in den PKC $\alpha$ -/- Zellen nicht beeinträchtigt zu sein.

Zusammenfassend zeigten sich weder in den VDCC noch in den VICC Beeinträchtigungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in den PKC $\alpha$ -/-  $\beta$ -Zellen.



**Abb. 3.6** Charakterisierung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher und des kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms. **A:** Die Stimulation mit Thapsigargin ( $2 \mu\text{M}$ ) führt im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium zur Entleerung intrazellulärer Speicher, repräsentative Spuren von 7-8 Experimenten; **B:** Mittelwerte  $\pm$  SEM des maximalen Anstieges im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium; **C:** Die Mittelwerte  $\pm$  SEM des maximalen Anstieges und der Plateau-Phase nach Gabe von extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  und daraus entstandenem kapazitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom.

### 3.2.5 Tabellarische Zusammenfassung der Veränderungen vom Ca<sup>2+</sup>-Signal in PKCα<sup>-/-</sup> β-Zellen

Secretagoga	β-Zellen (nM) / Kontrolle		PKCα <sup>-/-</sup> β-Zellen (nM)	
	Peak	Plateau	Peak	Plateau
CCh 10μM	627.3 ± 80.9	65.3 ± 8.1	736.9 ± 107.8	32.4 ± 14.3 ***
KCl 45mM	719.8 ± 96.6	123.4 ± 19.6	761.5 ± 111.5	126.8 ± 19.9
Tpg 2μM (pre-treatment: Nfd 10μM)	88.7 ± 7.9	45.2 ± 3.7	111.5 ± 8.2	49 ± 3.6
CCh 10μM (Ca-frei)	115.1 ± 47.1	---	88.7 ± 7.9	---
Tpg 2μM (Ca-frei)	30.3 ± 5	---	25.2 ± 4.7	---
Tpg 2μM (Ca-halt.; Ca-Wiedereinstrom)	75.5 ± 17.2	20.2 ± 3.5	78 ± 19	26.4 ± 3.6

**Tabelle 3.1** Zusammenfassung der Mittelwerte vom Aufstrich und Plateau ± SEM für die Ca<sup>2+</sup>-Signale nach Stimulation der PKCα<sup>-/-</sup> β-Zellen; \*-p<0.01 vs. Kontrollgruppe

Secretagoga	β-Zellen / Kontrolle AUC	PKCα <sup>-/-</sup> β-Zellen AUC
CCh 10μM	173.6 ± 23.9	115.4 ± 9.5 *
KCl 45mM	238.2 ± 18.6	278 ± 41
Tpg 2μM (pre-treatment: Nfd 10μM)	60.5 ± 6.9	58.5 ± 5.9
CCh 10μM (Ca-frei)	12.1 ± 3	15.7 ± 3.3
Tpg 2μM (Ca-frei)	22.7 ± 4.2	29.9 ± 11.2
Tpg 2μM (Ca-halt.; Ca-Wiedereinstrom)	67.6 ± 8	65.5 ± 9.6

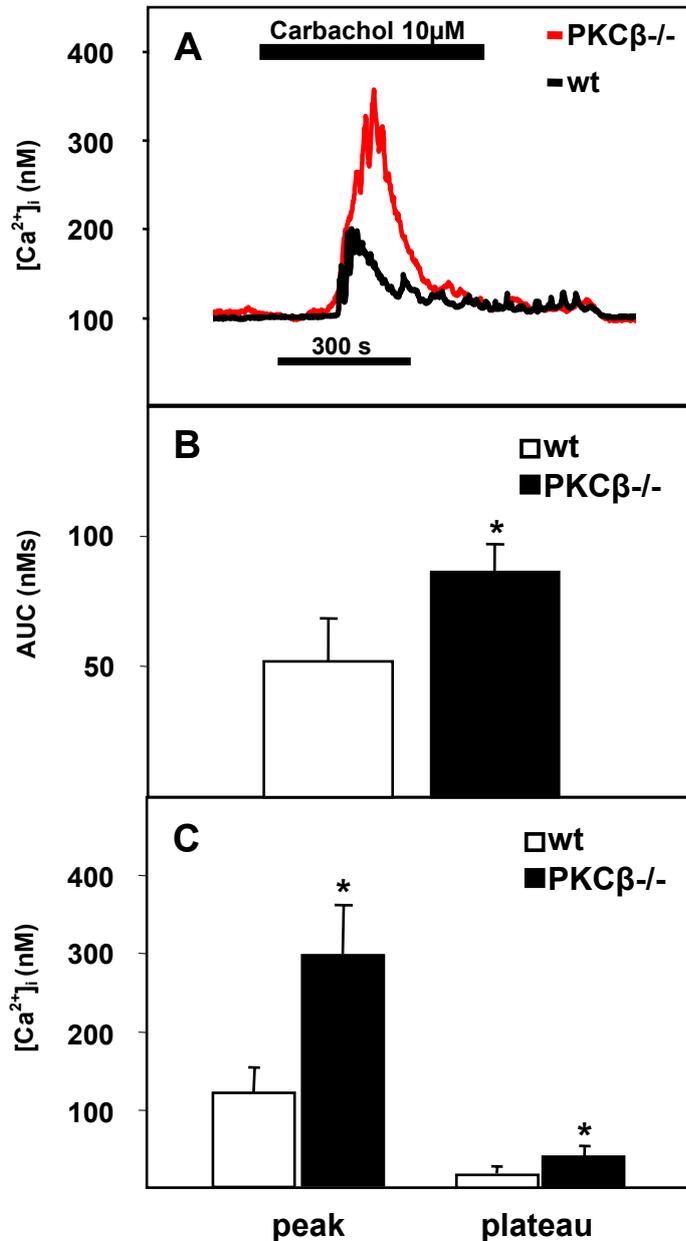
**Tabelle 3.2** Zusammenfassung der AUC-Werte des Ca<sup>2+</sup>-Signals nach Stimulation der PKCα<sup>-/-</sup> β-Zellen; \*-p<0.05 vs. Kontrollgruppe

### 3.3 Einfluss der PKC $\beta$ -Defizienz auf das ACh-bedingte Ca<sup>2+</sup>-Signal

#### 3.3.1 ACh-Stimulation der PKC $\beta$ -/- $\beta$ -Zellen

Die Stimulation der  $\beta$ -Zellen mit CCh führte sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den PKC $\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen zum deutlichen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Aufstrich mit anhaltendem Plateau, wobei beide Phasen des [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Signals bei den PKC $\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen signifikant vergrößert waren. Der Initialanstieg des [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Signals war bei den PKC $\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen (297.9 ± 47.7 nM, n=18) nahezu um das 3-fache gegenüber den Kontrollzellen (122.2 ± 37.1 nM, n=11; p<0.05) gesteigert. Auch das [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Plateau war bei den PKC $\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen signifikant erhöht (16.7 ± 5.9 nM vs. 39.8 ± 6.9 nM; p<0.05) (**Abb. 3.7**). Entsprechend war auch der AUC-Wert in der Gruppe der PKC $\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen gesteigert (46.3 ± 13.4 nMs vs. 86.1 ± 9.3 nMs; p<0.05).

Die nachgewiesene Veränderung des Ca<sup>2+</sup>-Signals in den PKC $\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen kann sowohl durch die gesteigerte Entleerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher als auch durch den Einstrom der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen über VDCC und VICC bedingt sein. In weiteren Experimenten sollen die entsprechenden Mechanismen der Ca<sup>2+</sup>-Regulation separat untersucht werden.

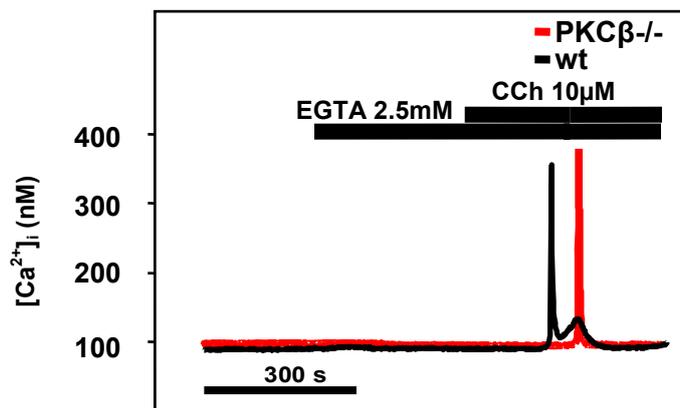


**Abb. 3.7** Einfluss der fehlenden PKC $\beta$ -Expression auf das Ca<sup>2+</sup>-Signal der  $\beta$ -Zellen nach Stimulation mit CCh. **A:** Repräsentative Spuren von 11-18 Messungen; **B:** Ca<sup>2+</sup>-Umsatz in den PKC $\beta$ <sup>-/-</sup>  $\beta$ -Zellen signifikant vergrößert; **C:** Deutlich vergrößerter [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Wert sowohl im Aufstrich als auch im Plateau; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*-p<0.05

### 3.3.2 ACh-bedingte Entleerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher

Wie bereits dargestellt, führt die Stimulation der muskarinischen Rezeptoren der  $\beta$ -Zellen sowohl zur Freisetzung der intrazellulär gespeicherten Ca<sup>2+</sup>-Ionen als auch zum Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über die Zellmembran.

Um die Beteiligung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher zu untersuchen, wurden die  $\text{PKC}\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium (incl. EDTA 2.5 mM) mit CCh stimuliert. Es kam zum transienten Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals ohne messbares Plateau. Die  $\text{PKC}\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen ( $n=10$ ) zeigten zwar tendenziell erhöhtes  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal gegenüber den Kontrollzellen ( $n=8$ ), dennoch war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant ( $181.3 \pm 52.4$  nM vs.  $257.2 \pm 87.2$ ;  $p=n.s.$ ). Auch die AUC war zwischen den beiden Gruppen gleich ( $13.4 \pm 2.5$  nMs vs.  $15.1 \pm 4.1$  nMs) (**Abb. 3.8**).



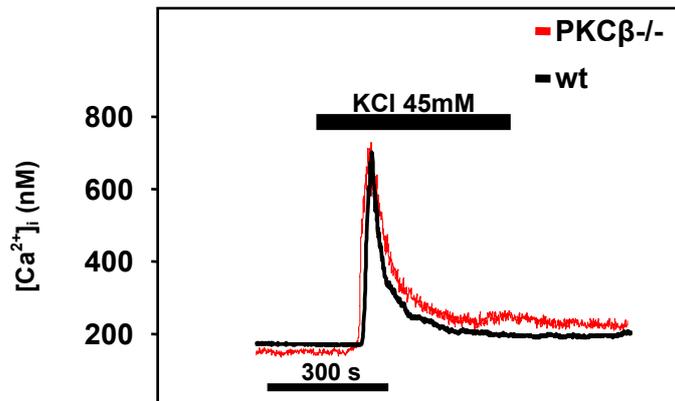
**Abb. 3.8** Stimulation der  $\beta$ -Zellen mit Carbachol im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium (EGTA 2,5 mM). Die Entleerung der intrazellulär gespeicherten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist in den  $\text{PKC}\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen unbeeinträchtigt. Repräsentative Spuren von 8-10 Zellen.

### 3.3.3 $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über VDCC in $\text{PKC}\beta^{-/-}$ $\beta$ -Zellen

Der ACh-bedingte Einstrom der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen findet sowohl über die VDCC als auch die VICC statt. Die Erhöhung der extrazellulären  $\text{K}^+$ -Konzentration führt zur Depolarisation der Zellmembran und zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über VDCC. Zur Überprüfung des VDCC-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die Zellmembran wurden, wie bereits im Kapitel 3.2.3 beschrieben, die  $\beta$ -Zellen mit 45 mM  $\text{K}^+$  stimuliert.

Nach Stimulation mit  $\text{K}^+$ -Ionen kam es sowohl bei den Kontrollzellen ( $n=11$ ) als auch bei den  $\text{PKC}\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen ( $n=14$ ) zu einem transienten Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals ( $431 \pm 63.7$  nM vs.  $560 \pm 66.6$  nM;  $p=n.s.$ ) mit einem anhaltendem Plateau ( $88.1 \pm 32.3$  nM vs.  $155 \pm 31.1$  nM;  $p=n.s.$ ) (**Abb. 3.9**).

Die AUC war zwischen den beiden Gruppen gleich ( $188.9 \pm 24.3$  nMs vs.  $217.8 \pm 18.6$  nMs;  $p=n.s.$ ).



**Abb. 3.9** Das  $Ca^{2+}$ -Signal nach Depolarisation der Zellmembran mit  $K^+$  45 mM in den PKC $\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen vs. Kontrollzellen. Repräsentative Spuren von 11-14 Experimenten.

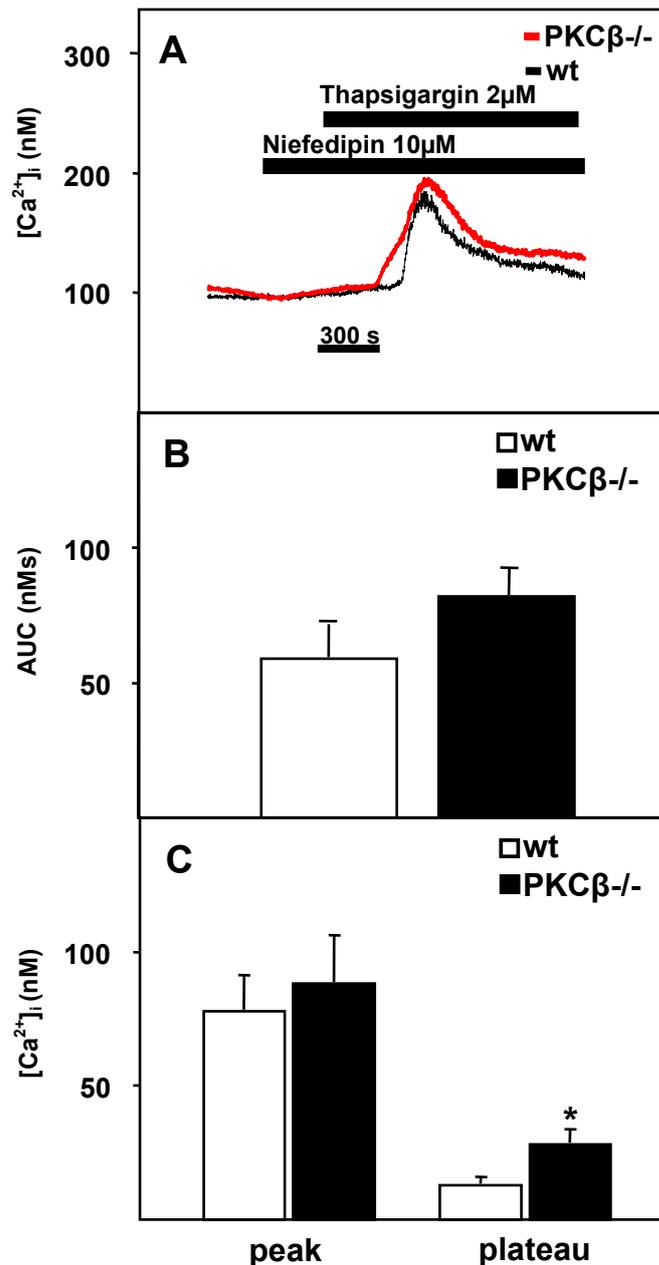
### 3.3.4 $Ca^{2+}$ -Einstrom über VICC in PKC $\beta^{-/-}$ $\beta$ -Zellen

Die Stimulation der  $\beta$ -Zellen mit Thapsigargin führt zur Entleerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher und zum kapazitativen Einstrom der  $Ca^{2+}$ -Ionen über die VICC, wie bereits ausführlich im Kapitel 3.2.4 dargestellt. Um den möglicherweise vorhandenen  $Ca^{2+}$ -Einstrom über die VDCC auszuschließen, wurden die  $\beta$ -Zellen erneut mit dem spezifischen VDCC (L-Typ) Inhibitor Nifedipin vorbehandelt.

Während der initiale Anstieg des  $Ca^{2+}$ -Signals in den  $\beta$ -Zellen beider Gruppen vergleichbar war ( $77.8 \pm 12.8$  nM vs.  $88 \pm 17.6$  nM;  $p=n.s.$ ), zeigten die PKC $\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen ( $n=9$ ) signifikant erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration im Plateau gegenüber den Kontrollgruppe ( $n=16$ ) ( $12.9 \pm 8.8$  nM vs.  $28.2 \pm 4.5$  nM;  $p<0.05$ ).

Die AUC war bei den PKC $\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen gegenüber den Kontrollzellen tendenziell vergrößert (**Abb. 3.10**), ohne dass signifikanter Unterschied bestand ( $59 \pm 7.1$  nMs vs.  $82 \pm 12.0$  nMs;  $p=n.s.$ ).

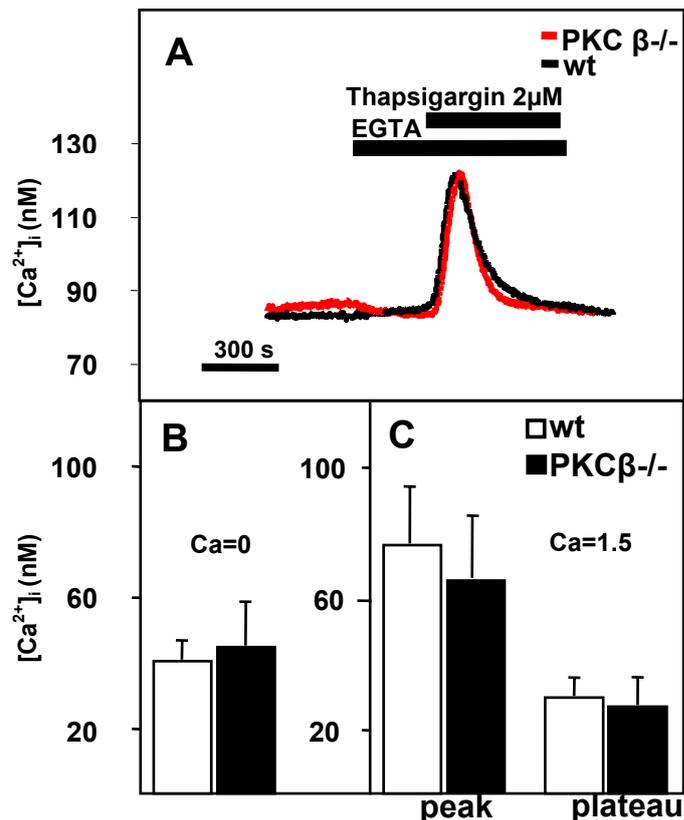
Zusammenfassend war das initiale  $Ca^{2+}$ -Signal nach Stimulation mit Thapsigargin gleich in beiden Versuchsgruppen, das  $Ca^{2+}$ -Signal in der Plateau-Phase war bei den PKC $\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen deutlich erhöht.



**Abb. 3.10** Kapazitiver Einstrom über VICC nach Stimulation mit Thapsigargin 2μM **A**: Repräsentative Spuren von 9-16 Experimenten; **B**: Die tendenzielle Erhöhung von AUC in den PKCβ-defizienten Zellen; **C**: Das [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Plateau signifikant erhöht bei PKCβ-defizienten β-Zellen; \* -p<0.05

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung des kapazitiven Ca<sup>2+</sup>-Einstroms über VICC besteht in der Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher im Ca<sup>2+</sup>-freien Medium mit nachfolgender Zufuhr extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Es kommt zur Auffüllung der zellulären Ca<sup>2+</sup>-Speicher über den Wiedereinstrom der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Schöfl et al., 1996).

Die Stimulation der  $\beta$ -Zellen mit Thapsigargin  $2\mu\text{M}$  im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium (incl. EDTA) führte zur Entleerung der zellulär gespeicherten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und zum Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Bei fehlendem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ließ sich keine Plateau-Phase nachweisen. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal war in den Kontrollzellen ( $n=13$ ) und den  $\text{PKC}\beta^{-/-}$  ( $n=11$ )  $\beta$ -Zellen gleich ( $44.8 \pm 13.5 \text{ nM}$  vs.  $40.5 \pm 5.4 \text{ nM}$ ;  $p=n.s.$ ) (**Abb. 3.11**).



**Abb. 3.11**  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern nach Stimulation mit Thapsigargin  $2\mu\text{M}$  im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium **A**: Repräsentative Spuren von 11-13 Experimenten; **B**: Transienter  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg nach Stimulation mit Thapsigargin  $2\mu\text{M}$  im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium; **C**: Transienter  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg und die Plateau-Phase nach einer Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf  $1.5 \text{ mM}$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM

Nach der Erhöhung der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf  $1.5 \text{ mM}$  kam es zum Einstrom der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die  $\beta$ -Zellen zeigten einen deutlichen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration mit einer anhaltenden Plateau-Phase. Die Veränderungen des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  waren nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zwischen den Kontrollzellen und  $\text{PKC}\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen, weder im Aufstrich ( $75.9 \pm 17.4 \text{ nM}$  vs.  $64.9 \pm 19.6 \text{ nM}$ ;  $p=n.s.$ ), noch im Plateau ( $29.4 \pm 5.2 \text{ nM}$  vs.  $26.8 \pm 8.1 \text{ nM}$ ;  $p=n.s.$ ). Auch die AUC war in beiden Gruppen gleich ( $89.5 \pm 15.9 \text{ nMs}$  vs.  $75.7 \pm 22.8 \text{ nMs}$ ;  $p=n.s.$ ).

### 3.3.5. Tabellarische Zusammenfassung der Veränderungen vom Ca<sup>2+</sup>-Signal in PKCβ<sup>-/-</sup> β-Zellen

Secretagoga	Wildtyp β-Zellen (nM)		PKCβ <sup>-/-</sup> β-Zellen (nM)	
	<i>Peak</i>	<i>Plateau</i>	<i>Peak</i>	<i>Plateau</i>
CCh 10μM	122.2 ± 37.1	16.7 ± 5.9	297.9 ± 47.7 *	39.8 ± 6.9 *
KCl 45mM	431 ± 63.7	88.1 ± 32.3	560 ± 66.6	155 ± 31.1
Tpg 2μM (pre-treatment: Nfd 10μM)	77.8 ± 12.8	12.9 ± 8.8	88 ± 17.6	28.2 ± 4.5 *
CCh 10μM (Ca-frei)	181.3 ± 52.4	---	257.2 ± 87.2	---
Tpg 2μM (Ca-frei)	40.5 ± 5.4	---	44.8 ± 13.5	---
Tpg 2μM (Ca-halt.; Ca-Wiedereinstrom)	75.9 ± 17.4	29.4 ± 5.2	64.9 ± 19.6	26.8 ± 8.1

**Tabelle 3.3** Zusammenfassung der Mittelwerte ± SEM des Ca<sup>2+</sup>-Signals für Aufstrich und Plateau nach Stimulation der PKCβ<sup>-/-</sup> β-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe; \*-p<0.05

Secretagoga	Wildtyp β-Zellen	PKCβ <sup>-/-</sup> β-Zellen
	<i>AUC</i>	<i>AUC</i>
CCh 10μM	46.3 ± 13.4	86.1 ± 9.3 *
KCl 45mM	188.9 ± 24.3	217.8 ± 18.6
Tpg 2μM (Vorbehandlung: Nfd 10μM)	59 ± 7.1	82 ± 12
Cch 10μM (Ca-frei)	13.4 ± 2.5	15.1 ± 4.1
Tpg 2μM (Ca-halt.; Ca-Wiedereinstrom)	89.5 ± 15.9	75.7 ± 22.8

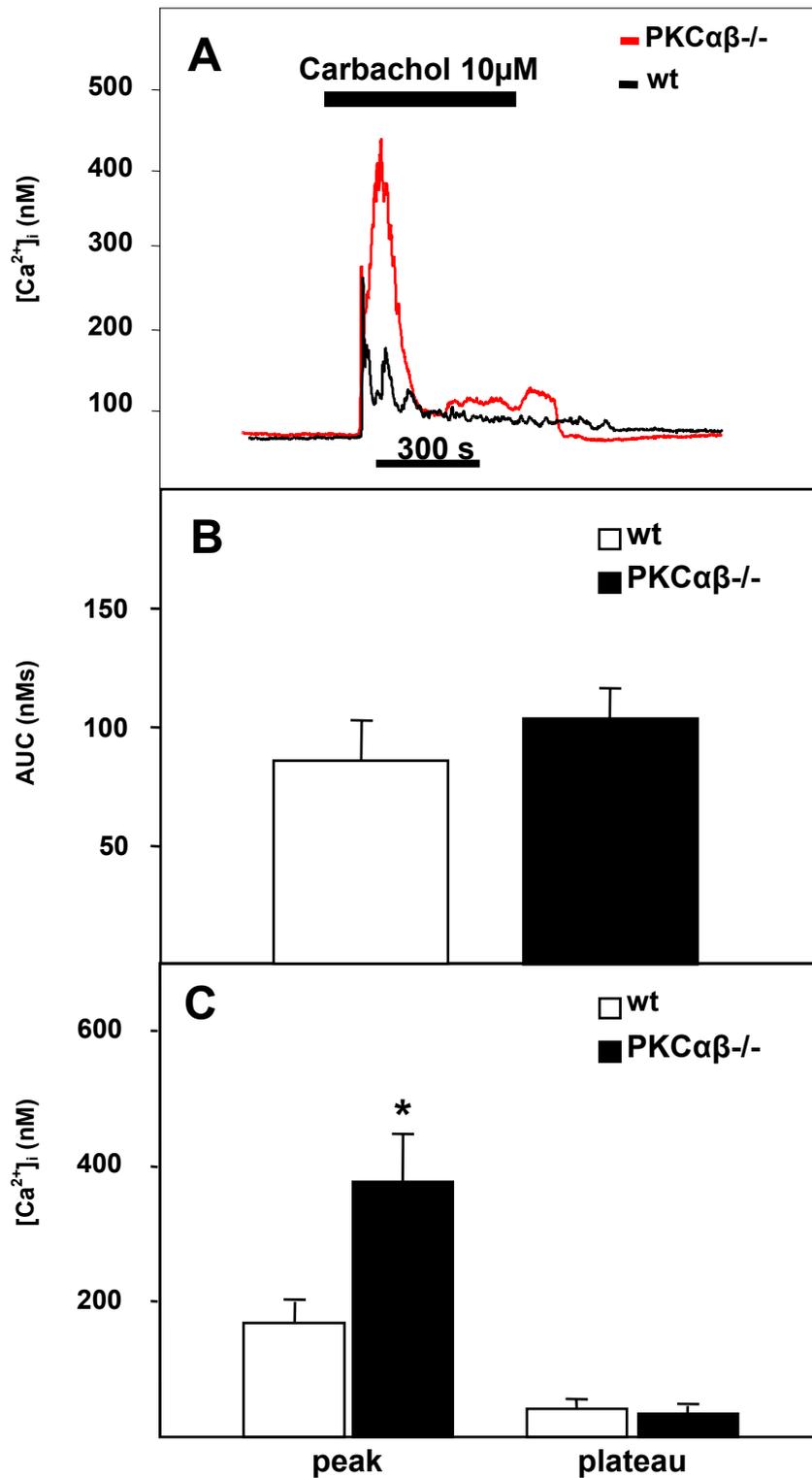
**Tabelle 3.4** Zusammenfassung der Werte für Ca<sup>2+</sup>-Umsatz nach Ca<sup>2+</sup>-Initialsignal in den PKCβ<sup>-/-</sup> β-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen; \*-p<0.05

### 3.4 Einfluss der kombinierten PKC $\alpha\beta$ -/- Defizienz auf das ACh- bedingte Ca<sup>2+</sup>-Signal

#### 3.4.1 ACh-Stimulation der PKC $\alpha\beta$ -/- $\beta$ -Zellen

Bei den PKC $\alpha\beta$ -/- Hybridmäusen handelt es sich um die homozygoten, PKC $\alpha\beta$ -/- Kreuzungen der beiden bereits verwendeten Mäusestämmen Sv-129 und B16, die jeweils PKC $\alpha$ -/- bzw. PKC $\beta$ -/- Defizienz zeigen. Als Kontrollgruppe wurden die Sv-129/B16-Mäuse verwendet, welche die beiden PKC-Isozyme exprimieren.

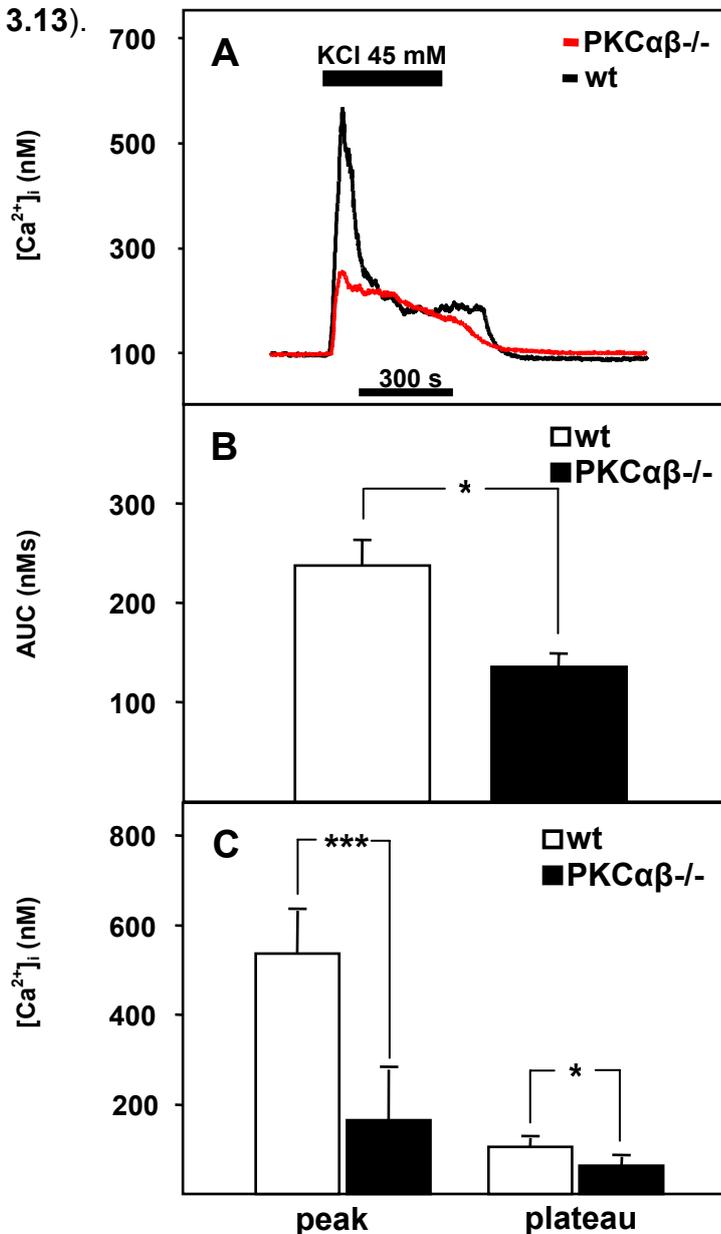
Die Stimulation mit CCh im calciumhaltigen Medium führte bei den PKC $\alpha\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen zum typischen Ca<sup>2+</sup>-Signal bestehend aus einem deutlichen Aufstrich und einer anhaltenden Plateau-Phase. Der Aufstrich war bei den PKC $\alpha\beta$ -/-  $\beta$ -Zellen ( $377.2 \pm 69.6$  nM; n=14) um die Hälfte größer als bei den Kontrollzellen ( $168.2 \pm 24.5$  nM; n=17; p< 0.05). Gleichzeitig waren weder das Plateau ( $41.6 \pm 10.1$  nM vs.  $34.2 \pm 7.8$  nM; p=n.s.) noch der AUC-Wert ( $85.9 \pm 16.6$  nMs vs.  $103.8 \pm 12,9$  nMs; p=n.s.) des Ca<sup>2+</sup>-Signals unterschiedlich (**Abb. 3.12**).



**Abb. 3.12** Stimulation der PKCαβ-/- β-Zellen mit CCh 10 μM; **A**: Repräsentative Spuren von 14-17 Spuren; **B**: Der Ca<sup>2+</sup>-Umsatz in PKCαβ-/- β-Zellen unverändert; **C**: Der Aufstich der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in β-Zellen nach Stimulation mit CCh in den PKCαβ-/- β-Zellen deutlich gesteigert; \*-p < 0.05.

### 3.4.2 $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über VDCC in $\text{PKC}\alpha\beta^{-/-}$ $\beta$ -Zellen

Die Kontrollzellen ( $n=17$ ) zeigten nach der Stimulation der  $\beta$ -Zellen mit  $\text{K}^+$ -Ionen ein regelrechtes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal, charakterisiert durch einen transienten Peak und ein lang anhaltendes Plateau. Bei den  $\text{PKC}\alpha\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen ( $n=14$ ) war nicht nur der Aufstrich des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals um mehr als das 3fache vermindert ( $537.7 \pm 59.5$  nM vs.  $165.6 \pm 22.5$  nM;  $p < 0.001$ ), sondern auch die Plateau-Phase signifikant verkleinert ( $105.1 \pm 16.4$  nM vs.  $63.3 \pm 7$  nM;  $p < 0.05$ ). Entsprechend war auch der AUC-Wert bei den  $\text{PKC}\alpha\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen signifikant vermindert ( $237.3 \pm 26.3$  nMs vs.  $135.3 \pm 13.9$  nMs;  $p < 0.01$ ) (Abb. 3.13).



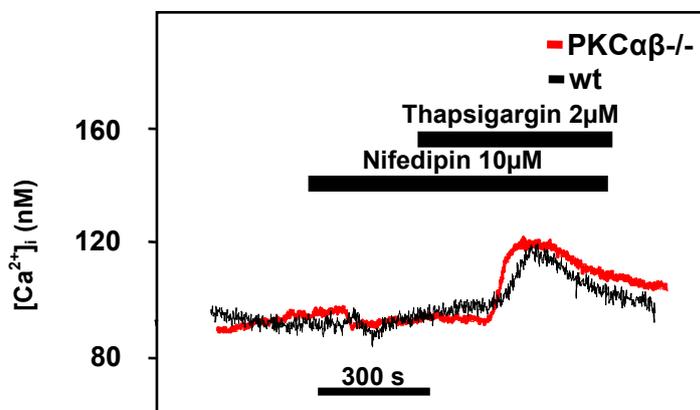
**Abb. 3.14** Depolarisation der  $\text{PKC}\alpha\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen mit KCl **A**: Repräsentative Spuren von 14-17 Experimenten; **B**: Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Umsatz in  $\text{PKC}\alpha\beta^{-/-}$  Zellen nach Depolarisation der Zellmembran vermindert; **C**: Die Verminderung des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals bei den  $\text{PKC}\alpha\beta^{-/-}$   $\beta$ -Zellen gegenüber den Kontrollzellen; \*- $p < 0.05$ ; \*\*\*- $p < 0.01$

### 3.4.3 $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über VICC in PKC $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> $\beta$ -Zellen

Vergleichbar mit vorangegangenen Experimenten bei den PKC $\alpha$ <sup>-/-</sup> und PKC $\beta$ <sup>-/-</sup>  $\beta$ -Zellen wurden die  $\beta$ -Zellen mit Thapsigargin (2 $\mu\text{M}$ ) behandelt. Die Inhibierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen führt zunächst zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären Speicher und daraufhin zum kapazitativen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über VICC aus dem extrazellulären Raum.

Um den unspezifischen Einstrom der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über VDCC auszuschließen, wurden die  $\beta$ -Zellen mit Nifedipin als spezifischem Blocker der VDCC vom L-Typ vorbehandelt.

Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal war in den PKC $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>  $\beta$ -Zellen (n=11) und den Kontrollzellen (n=9) gleich. Beide Gruppen reagierten mit einem transienten Peak des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals und einem messbaren Plateau nach Applikation von Thapsigargin; weder der initiale Anstieg ( $22 \pm 3.3 \text{ nM}$  vs.  $26.2 \pm 4.9 \text{ nM}$ ; p=n.s.), noch das Plateau ( $6.5 \pm 1.4 \text{ nM}$  vs.  $7.8 \pm 1.3 \text{ nM}$ ; p=n.s.) waren unterschiedlich (**Abb. 3.14**). Auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gesamtumsatz war zwischen beiden Gruppen gleich ( $15.1 \pm 1.3 \text{ nMs}$  vs.  $17.5 \pm 4.4 \text{ nMs}$ ; p=n.s.).



**Abb. 3.14** Stimulation der  $\beta$ -Zellen mit Thapsigargin 2 $\mu\text{M}$  bei blockierten VDCC vom L-Typ. Die PKC $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>  $\beta$ -Zellen zeigten keine Unterschiede im  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal gegenüber den Kontrollzellen. Repräsentative Spuren von 9-11 Experimenten

### 3.4.4 Tabellarische Zusammenfassung der Veränderungen vom Ca<sup>2+</sup>-Signal in PKCαβ<sup>-/-</sup> β-Zellen

Secretagogen	Wildtyp β-Zellen (nM)		PKCαβ <sup>-/-</sup> β-Zellen (nM)	
	<i>Peak</i>	<i>Plateau</i>	<i>Peak</i>	<i>Plateau</i>
CCh 10μM	168.2 ± 24.5	41.6 ± 10.1	377.2 ± 69.6*	34.2 ± 7.8
KCl 45mM	537.7 ± 59.5	105.1 ± 16.4	165.6 ± 22.5***	63.3 ± 7*
Tpg 2μM (pre-treatment: Nfd 10μM)	22 ± 3.3	6.5 ± 1.4	26.2 ± 4.9	7.8 ± 1.3

**Tabelle 3.5** Zusammenfassung der Mittelwerte vom Aufstrich und Plateau ± SEM für die Ca<sup>2+</sup>-Signale nach entsprechender Stimulation der PKCαβ<sup>-/-</sup> β-Zellen; \*-p<0.05; \*\*\*-p<0.01 vs. Kontrollgruppe

Secretagogen	Wildtyp β-Zellen <i>AUC</i>	PKCαβ <sup>-/-</sup> β-Zellen <i>AUC</i>
CCh 10μM	85.9 ± 16.6	103.8 ± 12,9
KCl 45mM	237.3 ± 26.3	135.3 ± 13.9***
Tpg 2μM (pre-treatment: Nfd 10μM)	15.1 ± 1.3	17.5 ± 4.4

**Tabelle 3.6** Zusammenfassung der AUC-Werte des Ca<sup>2+</sup>-Signals ± SEM in PKCαβ<sup>-/-</sup> β-Zellen; \*\*\*-p<0.01 vs. Kontrollgruppe