

4. Diskussion

4.1 Beteiligung des PKC α -Isozyms am ACh-induzierten [Ca²⁺]-Signal

Die PKC α -/- Tiere zeigten nur wenige Veränderungen im Phänotyp gegenüber den Kontrolltieren. Trotz der nahezu ubiquitären Expression des PKC α -Isozyms gab es keine Auffälligkeiten im äußeren Erscheinungsbild, der Lebensfähigkeit und der Fertilität der Maus. Es ließ sich leichte Steigerung der PI3K-Aktivität und der Glukose-Aufnahme über GLUT4 in Adipozyten und Muskelzellen feststellen (Leitges et al., 2002). Bei den Untersuchungen der Nierenfunktion fielen die minimale Verminderung der Konzentrationsfähigkeit der Niere und die eher protektiven Effekte der PKC α -Defizienz auf die Albuminurie in der diabetischen Maus auf (Menne et al., 2004; Yao et al., 2004). Weder bei der Glukose- noch bei der Insulinkonzentration im Blut waren Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den PKC α -/- Tieren nachweisbar (Leitges et al., 2002).

In unseren Experimenten wurde zunächst der Einfluss der PKC α -Defizienz auf das ACh-vermittelte Ca²⁺-Signal in den β -Zellen untersucht. Nach Stimulation der ACh-Rezeptoren kommt es zur Aktivierung des intrazellulären PLC/IP₃-Signalweges, DAG und IP₃ werden freigesetzt, es kommt zum Anstieg der [Ca²⁺]_i durch die Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher und den Einstrom von extrazellulären Ca²⁺-Ionen. Der Anstieg des [Ca²⁺]_i und des DAG führt zur Aktivierung und Translokation der cPKC-Enzyme, wie bereits in unterschiedlichen Untersuchungen von verschiedenen Zelltypen nachgewiesen (Fahrmann et al., 2003; Gilon and Henquin, 2001; Love et al., 1998). Inwieweit die cPKC Enzyme wie PKC α wiederum das ACh-induzierte Ca²⁺-Signal beeinflussen, wollten wir in unseren Experimenten mit PKC α -/- Tieren untersuchen.

Wir verwendeten in unseren Versuchen Carbachol, ein Analogon des physiologisch freigesetzten Neurotransmitters ACh. Nach Stimulation der nativen β -Zellen der Maus kommt es zum transienten Peak der [Ca²⁺]_i, gefolgt von einer anhaltenden Plateau-Phase. Die PKC α -/- β -Zellen zeigten zwar einen vergleichbaren Anstieg der [Ca²⁺]_i, gleichzeitig war die Plateau-Phase des Ca²⁺-Signals auf die Hälfte reduziert.

Der Initialanstieg der $[Ca^{2+}]_i$ kommt vor allem durch die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher zustande. Die Plateau-Phase des CCh-induzierten Ca^{2+} -Signals entsteht sowohl durch den Einstrom von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen als auch durch die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher. Die PKC α scheint vor allem in der zweiten Phase der Signaltransduktion involviert zu sein. Die Entleerung der intrazellulär gespeicherten Ca^{2+} -Ionen und der Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran kann durch die gezielte Blockade einzelner Kanäle und Transporter in der β -Zelle untersucht werden.

Die Stimulation der β -Zelle mit CCh im Ca^{2+} -freien Medium ermöglicht die Untersuchung der am Ca^{2+} -Signal beteiligten intrazellulär gespeicherten Ca^{2+} -Ionen. Der resultierende transiente Ca^{2+} -Anstieg ist deutlich verkleinert gegenüber dem Ca^{2+} -Signal im Ca^{2+} -haltigen Medium und weist keine Plateau-Phase auf. Der induzierte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ war in den PKC α -/- β -Zellen nicht signifikant unterschiedlich von den Kontrollzellen.

Eine weitere Möglichkeit, die Ca^{2+} -Entleerung aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern zu untersuchen, stellt die Stimulation der β -Zellen mit Thapsigargin im Ca^{2+} -freien Medium dar. Bei Thapsigargin handelt es sich um einen spezifischen Inhibitor der Ca^{2+} -ATPase am endoplasmatischen Retikulum der Zelle, wobei die Ca^{2+} -ATPasen der Zellmembran unbeeinträchtigt sind (Thastrup et al., 1990). Im Ca^{2+} -freien Medium kam es zu einem transienten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulation der β -Zellen mit Thapsigargin, ohne dass es Unterschiede zwischen den PKC α -/- β -Zellen und der Kontrollgruppe gab.

Sowohl die CCh-induzierte wie auch CCh-unabhängige Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher scheint in den PKC α -/- β -Zellen unbeeinträchtigt zu sein.

Eine weitere Möglichkeit, das CCh-induzierte Ca^{2+} -Signal zu untersuchen, stellt die Untersuchung der membranständigen Ca^{2+} -Kanäle dar, die separat aktiviert und geblockt werden können. Es handelt sich dabei um die membranständigen Ca^{2+} -Kanäle wie VDCC und VICC.

Zur Untersuchung der VDCC verwendeten wir K^+ -Ionen. Bei der Stimulation der β -Zellen mit Kalium kommt es zur Depolarisation der Zellmembran und

zum Einstrom des Ca^{2+} über VDCC aus dem extrazellulären Raum. Bei VDCC handelt es sich um eine ganze Familie von unterschiedlichen spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen, die sowohl nach phenomenologischen als auch nach strukturellen Gesichtspunkten eingeteilt werden. Bei den β -Zellen der Maus werden nur einige Ca^{2+} -Kanäle exprimiert (**Tabelle 4.1**).

<i>Current</i>	<i>Struktur</i>
L-Typ	Ca_V 1.2, Ca_V 1.3
P/Q-Typ	Ca_V 2.1
R-Typ	Ca_V 2.3

Tabelle 4.1 VDCC der Maus. Es werden zwei Klassifikationen unterschieden, nach funktionellen und strukturellen Aspekten. Beim L-Typ handelt es sich um den predominantesten Typ der VDCC in der β -Zelle der Maus.

Pharmakologische Untersuchungen zeigten, dass ca. 60 bis 80% des Ca^{2+} -Einstroms über die Zellmembran über die Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ stattfindet. In den β -Zellen werden die beiden strukturellen Formen des Ca^{2+} -Kanals vom L-Typ exprimiert, sowohl Ca_V 1.2 als auch Ca_V 1.3. Durch die Vorbehandlung mit einem Ca_V (1.2, 1.3) -Blocker Nifedipin sistiert nahezu der komplette Ca^{2+} -Einstrom über die spannungsabhängigen Kanäle (Davalli et al., 1996; Schulla et al., 2003; Yang and Berggren, 2005). Während die VDCC vom P/Q-Typ (Ca_V 2.1) auch in den β -Zellen zum Ca^{2+} -Influx und zur Insulinsekretion beitragen, gibt es erst wenige Publikationen zu den VDCC Kanäle vom R-Typ (Pereverzev et al., 2002; Schulla et al., 2003; Yang and Berggren, 2005)

Für den Ca_V 1.2-Kanal existieren Hinweise für die Phosphorylierung durch die $\text{PKC}\alpha$. In unterschiedlichen Zelltypen wurde die Beteiligung der PKC -Enzyme an der Regulation von Ca_V -Kanälen gezeigt (Blumenstein et al., 2002; Haynes et al., 2002; Love et al., 1998). Basierend auf diesen Publikationen erscheint die Beteiligung des $\text{PKC}\alpha$ -Isozyms an der Regulation der Ca_V -Kanäle zumindest theoretisch möglich.

Dennoch zeigte die Depolarisation der $\text{PKC}\alpha$ -/- β -Zellen keine Veränderungen der Amplitude des Ca^{2+} -Signals und des Ca^{2+} -Umsatzes.

Die PKC α -/ β -Zellen weisen einen unbeeinträchtigten Ca²⁺-Einstrom über Ca_V auf, zumindest bei gleichzeitiger Expression anderer PKC-Isoformen.

Eine weitere Möglichkeit zum Ca²⁺-Influx besteht über die VICC, und wird auch als kapazitiver Ca²⁺-Einstrom bezeichnet. Es handelt sich dabei um den Ca²⁺-Einstrom über die Zellmembran, welcher nach der Entleerung der intrazellulären IP₃-empfindlichen Ca²⁺-Speicher stattfindet und am ehesten der Wiederauffüllung der Ca²⁺-Speicher dient (Miura et al., 1997; Parekh and Penner, 1997; Putney and Bird, 1993; Schöfl et al., 1996). Auch bei einem CCh-induzierten Ca²⁺-Signal konnte kapazitiver Einstrom nachgewiesen werden (Mears, 2004). Die Entleerung der intrazellulären Speicher aktiviert aber auch die Ca_V-Kanäle (Worley et al., 1994), möglicherweise über eine zusätzliche Depolarisation der Zellmembran. Um den Ca²⁺-Einstrom über VICC darstellen zu können, wurden die β -Zellen mit Nifedipin, einem selektiven Blocker der Ca_V (1.2, 1.3) -Kanäle, vorbehandelt. Da der Einstrom der Ca²⁺-Ionen über die VDCC vorwiegend über die Ca_V-Kanäle vom L-Typ stattfindet, lässt sich durch die Vorbehandlung mit Nifedipin der Ca²⁺-Einstrom über VICC messen.

Bei den β -Zellen der Maus werden vor allem zwei Typen der VICC exprimiert, TRPC1 und TRPC 4. Die entsprechende Rolle der einzelnen TRP-Kanäle am Ca²⁺-Influx ist bisher unklar (Mears and Zimlik, 2004; Qian et al., 2002). Die Phosphorylierung der TRP-Kanäle durch die PKC-Isozyme konnte indirekt in der glatten Muskulatur nachgewiesen werden (Albert and Large, 2006; Liu et al., 2005).

In den Experimenten an humanen mesangialen Zellen führte die pharmakologische PKC α - und PKC β -Inhibierung zur signifikanten Verminderung des Thapsigargin-induzierten Ca²⁺-Anstiegs und die Vorbehandlung mit PKC α -antisense zur Verminderung des kapazitiven Ca²⁺-Einstroms (Ma et al., 2002). In den Epithelzellen wurde die Phosphorylierung der TRP-Kanäle durch PKC α und deren Beteiligung am Thapsigargin-induzierten Ca²⁺-Einstrom nachgewiesen (Ahmed et al., 2004). Insbesondere für das PKC α -Isozym existieren in der Literatur Hinweise für die Modifikation der TRP-Kanäle, die in die Regulation des Ca²⁺-Haushaltes der Zelle involviert sind.

Die Stimulation der β -Zellen mit Thapsigargin bei blockierten Ca_V -Kanälen vom L-Typ führt im Ca^{2+} -haltigen Medium zum transienten Peak und einem anhaltenden Plateau. Das Thapsigargin führt zur Hemmung der Ca^{2+} -ATPase am endoplasmatischen Retikulum der β -Zelle und zum Initialanstieg des Ca^{2+} -Signals. Die Plateau-Phase kommt durch den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum zustande. In unseren Experimenten an $\text{PKC}\alpha$ -/- β -Zellen zeigten sich keine Veränderungen des Ca^{2+} -Signals. Der kapazitiven Einstrom der extrazellulären Ca^{2+} -Ionen scheint unbeeinträchtigt zu sein.

Eine weitere Möglichkeit, den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom zu untersuchen, ist die Stimulation der β -Zellen mit Thapsigargin zunächst im Ca^{2+} -freien Medium. Die Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf 1.5 mM führt zum kapazitiven Einstrom der Ca^{2+} -Ionen. Die $\text{PKC}\alpha$ -/- β -Zellen zeigten keine Veränderungen des Ca^{2+} -Signals. Die fehlende Expression der $\text{PKC}\alpha$ scheint den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom nicht zu beeinträchtigen. Weder bei der Freisetzung der intrazellulär gespeicherten Ca^{2+} -Ionen noch im Ca^{2+} -Einstrom über VDCC und VICC zeigt sich eine Beeinträchtigung des Ca^{2+} -Signals in den $\text{PKC}\alpha$ -/- β -Zellen. Dennoch lässt sich bei den $\text{PKC}\alpha$ -/- β -Zellen ein vermindertes Ca^{2+} -Signal nach der Stimulation der Zellen mit CCh nachweisen.

Eine mögliche Erklärung des verminderten Ca^{2+} -Plateaus in den $\text{PKC}\alpha$ -/- β -Zellen ist die Beteiligung des $\text{PKC}\alpha$ -Isozyms an der ACh-vermittelten Regulation der membranständigen Ca^{2+} -Kanäle. Die fehlende $\text{PKC}\alpha$ -Expression führt zur Verminderung des Ca^{2+} -Signals. In der Literatur gibt es nur wenige Hinweise für die Beteiligung der $\text{PKC}\alpha$ -Isoform an der ACh-vermittelten Signaltransduktion und Aktivierung der membranständigen Ca^{2+} -Kanäle. In Neuronen wurde bereits die PKC-abhängige G-Protein-Phosphorylierung der Ca_V -Kanäle beschrieben (Zamponi et al., 1997), ein ähnlicher Mechanismus wäre in den β -Zellen vorstellbar, ist aber bisher nicht nachgewiesen worden.

Zusammenfassend zeigte sich in den $\text{PKC}\alpha$ -/- β -Zellen eine weitestgehend unbeeinträchtigte Regulation des zellulären Ca^{2+} -Signals. Erst bei komplexen zellulären Vorgängen wie ACh-bedingter Ca^{2+} -Freisetzung kommt es zu Veränderungen des intrazellulären Ca^{2+} -Signals. Inwieweit eine

ergänzende Überexpression anderer PKC-Isoformen wie der PKC β die Funktionen von PKC α teilweise oder vollständig übernehmen könnte, lässt sich aus diesen Versuchen nicht ableiten. Diese Form der intrazellulären Kompensation bei verminderter Expression eines Isozyms wurde bereits für die anderen PKC-Isoformen (PKC ζ vs. PKC λ) nachgewiesen (Bandyopadhyay et al., 2004; Farese, 2002). Die Möglichkeit der gegenseitigen Kompensation einzelner cPKC-Enzyme wird zusätzlich im **Kapitel 4.3** diskutiert.

4.2 Beteiligung des PKC β -Isozyms am ACh-induzierten [Ca²⁺]_i-Signal

Ähnlich wie die PKC α -/-, sind die PKC β -/- Mäuse lebensfähig und zeigen abgesehen von der leicht veränderten Fellfärbung keine phänotypischen Unterschiede in der Lebensfähigkeit und der Fertilität gegenüber Kontrolltieren. In den weiterführenden Untersuchungen weisen PKC β -/- Mäuse einige Defekte in der humoralen Immunabwehr mit deutlich verminderter Zellzahl der B-Lymphozyten und starker Reduktion der IgM-Serumfraktion auf (Leitges et al., 1996). Die IL-6 Sekretion durch die PKC β -/- Mastzellen war deutlich vermindert (Nechushtan et al., 2000). Ein bisher angenommener protektiver Effekt der PKC β auf die Hypertrophie der Cardiomyozyten ließ sich in den PKC β -/- Mäusen nicht nachgewiesen (Roman et al., 2001). Die PKC β -/- Mäuse zeigten verminderte Glukosekonzentration im Serum, gleichzeitig war die Glukoseaufnahme in die Adipozyten deutlich gesteigert (Leitges et al., 2002).

Die Stimulation der β -Zellen mit ACh führt zum deutlichen Ca²⁺-Peak und einer anhaltenden Plateau-Phase. Die Aktivierung der ACh-Rezeptoren führte bei den PKC β -/- β -Zellen zu einer deutlichen Veränderung des Ca²⁺-Signals gegenüber den Kontrollzellen. Der initiale Peak des Ca²⁺-Signals war bei den PKC β -/- β -Zellen deutlich vergrößert, zusätzlich kam es zu einer signifikanten Erhöhung des Signals in der Plateau-Phase der Stimulation. Der initiale Peak des Ca²⁺-Signals kommt nach der Stimulation mit ACh vorwiegend durch die Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher zustande. Die β -Zellen wurden mit CCh im Ca²⁺-freien Medium stimuliert, um den Einstrom der extrazellulären Ca²⁺-Ionen auszuschließen. Es zeigte

sich ein transienter Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ohne eine Plateau-Phase, vergleichbar mit den Kontrollzellen. Auch die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher nach Blockade der intrazellulären Ca^{2+} -ATPase mit Thapsigargin im Ca^{2+} -freien Medium zeigte keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den PKC β -/- β -Zellen. Die Entleerung der intrazellulär gespeicherten Ca^{2+} -Ionen scheint in den PKC β -/- β -Zellen unbeeinträchtigt zu sein.

Zur weiteren Klärung der nachgewiesenen Veränderungen des Ca^{2+} -Signals nach CCh-Stimulation wurde der Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran untersucht. In der Literatur existieren einige indirekte Hinweise auf die Beteiligung der PKC β an der Regulation und Phosphorylierung unterschiedlicher Ionenkanäle (Ma et al., 2002; Wang et al., 2004; Zhang et al., 1997), so dass in weiteren Versuchen die Funktion der VDCC und der VICC untersucht wurde.

Die Depolarisation der β -Zellen mit K^+ -Ionen führt zum Einstrom des extrazellulären Calciums vor allem über die Ca_v (1.2, 1.3) -Kanäle. Sowohl bei den PKC β -/- β -Zellen als auch bei der Kontrollgruppe kam es zu einem deutlichen Peak der $[Ca^{2+}]_i$ mit einer anhaltenden Plateau-Phase. Das Ca^{2+} -Signal war in beiden Gruppen gleich. Die fehlende Expression des PKC β -Isozyms scheint den Ca^{2+} -Einstrom über die spannungsabhängigen Kanäle nach Depolarisation der Zellmembran zunächst nicht zu beeinträchtigen.

Die β -Zellen zeigen zusätzlich zum Ca^{2+} -Einstrom über Ca_v -Kanäle einen spannungsunabhängigen Ca^{2+} -Einstrom, am ehesten über die nachgewiesenen TRP-Kanäle. Die Blockade der intrazellulären Ca^{2+} -ATPase mit Thapsigargin führt zunächst zur Entleerung der Ca^{2+} -Speicher, gefolgt vom kapazitativen Einstrom der Ca^{2+} -Ionen aus dem extrazellulären Raum (Putney and Bird, 1993; Thastrup et al., 1990). Die β -Zellen wurden mit Nifedipin vorbehandelt, um den Ca^{2+} -Einstrom über die Ca_v -Kanäle vom L-Typ auszuschließen. Es kam sowohl bei den PKC β -/- β -Zellen wie auch bei den Kontrollzellen zum deutlichen Ca^{2+} -Signal, mit einem transienten Peak und einer Plateau-Phase. Bei der Plateau-Phase handelt es sich um den Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum, bei ausgeschalteten Ca_v (1.2, 1.3)- Kanälen kommt es vor allem zum kapazitativen Einstrom über die spannungsunabhängigen Kanäle, möglicherweise über die TRP-Kanäle. Die PKC β -/- β -Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung des Ca^{2+} -Signals in

der Plateau-Phase gegenüber den Kontrollzellen. In der Literatur gibt es Hinweise auf die Interaktionen zwischen TRP-Kanälen und PKC-Enzymen (Ahmmed et al., 2004). In der weiteren Versuchsreihe zum kapazitiven Einstrom wurden die β -Zellen zunächst im Ca^{2+} -freien Medium mit Thapsigargin behandelt, es kam zu Entleerung der intrazellulären Speicher. Im zweiten Schritt wurde die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht, es kam zum kapazitiven Einstrom der Ca^{2+} -Ionen aus dem extrazellulären Raum. Das Ca^{2+} -Signal war in den PKC β -/- β -Zellen nicht signifikant gegenüber den Kontrollzellen. Dieser Widerspruch bleibt zunächst ungelöst. Möglicherweise kam es in der zweiten Versuchsreihe zu einer Co-Aktivierung der Ca_V -Kanäle, da keine Blockade mit Nifedipin erfolgte.

Zusammenfassend scheint das PKC β -Isozym über die Aktivierung eines negativen Feedback-Mechanismus auf der Ebene des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms an der Generierung der ACh-induzierten Ca^{2+} -Signale beteiligt zu sein. Die genauen Mechanismen der PKC β -abhängigen Regulation dieser Ca^{2+} -Kanäle verbleiben unklar.

Das PKC β -Isozym scheint vor allem einen hemmenden Einfluss auf die Regulation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und den Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum zu haben. Diese Ergebnisse stehen im gewissen Widerspruch zu den Studien mit Überexpression von PKC β in den Cardiomyozyten (Huang et al., 2001), wo die erhöhte PKC β -Expression zu deutlicher Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der Ca^{2+} -Amplitude führte. Diese Befunde unterstreichen erneut die Schwierigkeiten bei der Erforschung der PKC-Familie, da das gleiche Enzym unterschiedliche Funktionen in unterschiedlichen Zelltypen ausüben kann.

4.3 Wirkung der kombinierten cPKC-Defizienz auf das ACh-induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal

Aufgrund der funktionellen und strukturellen Ähnlichkeit zwischen den PKC α - und PKC β -Enzymen und bereits beschriebener Möglichkeit der gegenseitigen Kompensation entschieden wir uns für die Untersuchung des ACh-induzierten Ca^{2+} -Signals in PKC $\alpha\beta$ -/- β -Zellen. Die Mehrheit der Publikationen weisen daraufhin, dass die PKC γ -Isoform nicht in den β -Zellen der Maus exprimiert wird (Jones and Persaud, 1998). Die PKC $\alpha\beta$ -/- β -Zellen

können daher zur Erforschung der Rolle von cPKC für die Generierung des Ca^{2+} -Signals verwendet werden.

Zu den PKC $\alpha\beta$ -/- Mäusen existieren bis heute keine Veröffentlichungen. Die Tiere sind steril, sie stammen aus einer Kreuzung PKC α -/- und PKC β -/- Tiere. Da es sich bei den PKC α - und bei den PKC β -/- Mäusen um die unterschiedlichen Mäusestämme handelt (SV-129 ggf. BI-6), mussten die PKC $\alpha\beta$ -Kontrolltiere auch aus entsprechend PKC α -/- und PKC β -/- Mäusestämmen gezüchtet werden. Zusätzlich sind die PKC $\alpha\beta$ -/- Tiere kleiner und zeigen eine erhöhte Mortalitätsrate. All diese Faktoren schränkten die Anzahl der Experimente erheblich ein.

Nach der Stimulation der PKC $\alpha\beta$ -/- β -Zellen mit CCh kam es zu einem transienten Ca^{2+} -Peak und einem anhaltenden Ca^{2+} -Plateau. Die Amplitude des Initial-Peaks war bei den PKC $\alpha\beta$ -/- β -Zellen gegenüber den Kontrollzellen signifikant vergrößert und entsprach in etwa dem Anstieg des Ca^{2+} -Signals bei den PKC β -/- β -Zellen. Die Plateau-Phase des Ca^{2+} -Signals war nicht beeinträchtigt, anders als bei den PKC α -/- und PKC β -/- β -Zellen. Die PKC α -/- β -Zellen zeigten ein gegenüber den Kontrollzellen deutlich erniedrigtes Plateau, während bei den PKC β -/- β -Zellen das Plateauniveau deutlich erhöht war. Diese Befunde weisen auf die spezifische Funktion einzelner PKC-Isozyme bei der Regulation des Ca^{2+} -Einstroms aus dem extrazellulären Raum..

Die Depolarisation der Zellmembran mit Kalium führt in der β -Zelle zu einem kräftigen Initialanstieg der Ca^{2+} -Konzentration mit anhaltend hohem Plateau. Es handelt sich vorwiegend um den Ca^{2+} -Einstrom über die Ca_V -Kanäle vom L-Typ. Weder die PKC α -/- noch die PKC β -/- β -Zellen zeigten signifikante Veränderungen des Ca^{2+} -Signals bei der direkten Depolarisation der Zellmembran. Bei den PKC $\alpha\beta$ -/- β -Zellen kam es zur deutlichen Verminderung des Initialanstiegs, auch das Ca^{2+} -Signal in der Plateau-Phase war signifikant kleiner. Offensichtlich können die einzelnen cPKC-Isoformen die Funktion der Ca_V -Kanäle aufrechterhalten, während erst das Fehlen beider Isoformen zu einem verminderten Einstrom der Ca^{2+} -Ionen über die Ca_V -Kanäle vom L-Typ führt. Die Ca_V -Kanäle werden in unterschiedlichen Zelltypen durch die PKC-Enzyme phosphoryliert (McCarty, 2006), offensichtlich führt die fehlende Expression der cPKC-Isozyme zu

deutlicher Einschränkung der Funktion von spannungsabhängigen Kanälen, insbesondere von Ca_v -Kanälen vom L-Typ.

Für die genauen Aussagen über die Beteiligung einzelner zellulärer Kanäle bedarf es sicherlich weiterführender elektrophysiologischer Untersuchungen. Bei der Freisetzung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher über die Stimulation der Zelle mit Thapsigargin zeigten sich keine signifikanten Veränderungen weder im Initialanstieg der Ca^{2+} -Konzentration noch in der Phase des kapazitiven Einstroms. Die $PKC\beta^{-/-}$ Zellen zeigten eine deutliche Erhöhung des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms in der gleichen Versuchsanordnung. Möglicherweise kam die Ca^{2+} -Erhöhung bei den $PKC\beta^{-/-}$ β -Zellen vor allem durch die Funktion von dem immer noch exprimierten $PKC\alpha$ -Isozym.

Zusammenfassend sind $PKC\alpha$ und $PKC\beta$ für die Auslösung eines ACh-Signals wichtig, die Funktionen sind jeweils spezifisch, können sich aber auch kompensieren. Auf molekularer Ebene ist die Funktion einzelner Isozyme weiterhin unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten wir mit Hilfe der drei untersuchten Maus-Modelle mit $PKC\alpha^{-}$, $PKC\beta^{-}$ und $PKC\alpha^{-}/PKC\beta^{-}$ -Defizienz die Beteiligung der beiden Isozyme am ACh-vermittelten intrazellulären Ca^{2+} -Signal in den insulinsezernierenden β -Zellen nachweisen. Hierbei zeigte es sich eine Kombination aus hemmenden, aber auch fördernden Einflüssen dieser PKC -Isoformen auf das Ca^{2+} -Signal, wobei vor allem der Einstrom des Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum beeinträchtigt wurde. Die Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aus den intrazellulären Speichern blieb in unseren Experimenten in allen knock-out-Modellen unbeeinträchtigt. Während die $PKC\alpha$ -Defizienz nur zu einer leichten Verminderung des ACh-bedingten Ca^{2+} -Signals in der Plateau-Phase führte, kam es in den $PKC\beta^{-/-}$ β -Zellen zu deutlicher Vergrößerung des Ca^{2+} -Signals nach ACh-Stimulation. Die $PKC\beta$ -Defizienz führte hierbei vor allem zur Vermehrung des Ca^{2+} -Einstroms über die spannungsunabhängigen Ca^{2+} -Kanäle, wie in der Versuchsreihe mit Thapsigargin-Blockade der intrazellulären Ca^{2+} -ATPasen nachgewiesen

werden konnte. Die PKC β scheint vorwiegend eine hemmende Wirkung auf den Ca²⁺-Einstrom auszuüben. Die PKC $\alpha\beta$ -/- β -Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung des Initial-Peaks nach ACh-Stimulation, der vermehrte Ca²⁺-Einstrom über spannungsunabhängige Kanäle konnte in den PKC $\alpha\beta$ -/- β -Zellen nicht nachgewiesen werden.

Während in den PKC α -/- und PKC β -/- β -Zellen der Ca²⁺-Einstrom über Ca_v-Kanäle nach der Depolarisation der Zellmembran unverändert blieb, zeigten die PKC $\alpha\beta$ -/- β -Zellen eine deutliche Verminderung des Ca²⁺-Einstroms über Ca_v (Ca_v 1.2, Ca_v 1.3) nach der Depolarisation der Zellmembran mit K⁺-Ionen. Offensichtlich verfügen die cPKC-Enzyme der β -Zelle über die Möglichkeit, einander zu kompensieren. Dennoch handelt es sich um Enzyme mit spezifischer Funktion. Die weitere Erforschung dieser Zusammenhänge würde zum besseren Verständnis der physiologischen aber auch der pathophysiologischen Vorgänge in der β -Zelle führen und langfristig auch neue Möglichkeiten zur Entwicklung nächster Generationen unterschiedlicher Antidiabetika führen, die zur Behandlung vom Diabetes Typ 2 beitragen könnten.