

Die Rolle von GPR40-Agonisten für die Funktion pankreatischer β -Zellen

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Graf, geb. Cornejo Diaz, Dunia

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Peter Krippeit-Drews

2. Berichterstatter: Professor Dr. Cora Weigert

For Benjamin and for my parents, with love.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Einleitung	5
1.1 Das Hormon Insulin	5
1.1.1 Aufrechterhaltung von Normoglykämie	5
1.1.2 Langerhans-Inseln: Insulinbiosynthese und Exozytose	6
1.1.3 Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion	7
1.1.4 Insulinwirkung	9
1.1.5 Regulation der Insulinsekretion	10
1.2 Diabetes mellitus	11
1.3 Der GPR40-Rezeptor und seine Agonisten	13
1.4 Fragestellung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Inselpräparation und Gewinnung von Inselzellclustern	16
2.1.1 Material	16
2.1.1.1 Tiere	16
2.1.1.2 Geräte	16
2.1.1.3 Chemikalien	17
2.1.1.4 Lösungen	17
2.1.2 Methoden	18
2.1.2.1 Präparation	18
2.1.2.2 Gewinnung von Inselzellclustern	19
2.2 Fluoreszenzoptische Bestimmung von intrazellulärem Ca ²⁺	20
2.2.1 Material	20
2.2.1.1 Geräte	20
2.2.1.2 Chemikalien	20
2.2.1.3 Lösungen	21
2.2.2 Methode	22
2.2.2.1 Messprinzip	22
2.2.2.2 Aufbau der Messanlage	23

2.3 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	23
3. Ergebnisse	25
3.1 Einfluss von TUG469 auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in β -Zellen von GPR40 Wildtyp-Mäusen	25
3.2 Einfluss von TUG469 auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in β -Zellen von GPR40 Knockout-Mäusen	36
3.3 Einfluss von CLA 9/11 und CLA 10/12 auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in β -Zellen von GPR40 Wildtyp-Mäusen	40
3.4 Einfluss von CLA 9/11 und CLA 10/12 auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in β -Zellen von GPR40 Knockout-Mäusen	43
4. Diskussion	47
5. Zusammenfassung	54
6. Literaturverzeichnis	56
7. Erklärung zum Eigenanteil	62
8. Danksagung	63
9. Lebenslauf	64

Abkürzungen

°C	Grad Celcius
$[Ca^{2+}]_c$	zytosolische Ca^{2+} -Konzentration
μM	Mikromolar
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AUC	<i>area under the curve</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cAMP	cyclisches AMP
CLA	<i>conjugated linoleic acid</i>
C-Peptid	<i>connecting peptide</i>
D600	Ca^{2+} -Antagonist
DAG	Diacylglycerol
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	lat. <i>et alia</i> (und andere)
FFA1	<i>free fatty acid receptor 1</i>
GIP	glucoseabhängiges insulinotropes Peptid
GPR40	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 40
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GLUT-2	Glucosetransporter Typ 2
GLUT-4	Glucosetransporter Typ 4
IP ₃	Inositoltriphosphat
K _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver K ⁺ -Kanal
KO	Knockout
l	Liter

M ₃ -Rezeptor	muskarinischer Acetylcholinrezeptor 3
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm
mmol	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
PLC	Phospholipase C
PP-Zellen	pankreatisches Polypeptid enthaltende Zellen
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des Sarko-/Endoplasmatischen Retikulum
TAK875	synthetischer GPR40-Agonist
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TUG469	synthetischer GPR40-Agonist
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das Hormon Insulin

1.1.1 Aufrechterhaltung von Normoglykämie

Bei Menschen mit einem gesunden Stoffwechsel wird die Glucosekonzentration im Blut in sehr engen Grenzen gehalten. Sie liegt morgens im nüchternen Zustand bei 80-100 mg/dl (4,5-5,6 mmol/l) und steigt nach einer Mahlzeit nicht über 140 mg/dl (7,8 mmol/l), obwohl die mit der Nahrung aufgenommene Glucosemenge starken Schwankungen unterliegt. Organe wie das Gehirn, welches Glucose als obligates Substrat zur Deckung seines Energiebedarfs benötigt, werden dadurch ausreichend versorgt und gleichzeitig wird die durch hohe Glucosekonzentrationen verursachte Schädigung der Gefäßzellen verhindert. Für diesen Mechanismus sind verschiedene Hormone wichtig. Während Glukagon, Adrenalin und Somatotropin die Glucosekonzentration im Blut über Stimulation der Gluconeogenese und der Glykogenolyse steigern, bleibt Insulin als einziges Hormon, das den Blutzuckerspiegel senken kann. Es sorgt für die Glucoseaufnahme in die Skelettmuskelzellen und Fettzellen und für die Verstoffwechslung der Glucose in diesen Zellen sowie Leberzellen.

Das Krankheitsbild Diabetes mellitus beinhaltet eine Gruppe von metabolischen Erkrankungen, deren Gemeinsamkeit eine Erhöhung der Glucose im Blut ist. Diese Erkrankung beruht auf einem absoluten Insulinmangel, verursacht durch eine Autoimmunreaktion oder einem relativen Insulinmangel mit zwei wichtigen Komponenten: Störungen in der Freisetzung und in der Wirkung von Insulin. Die dadurch verursachte chronische Hyperglykämie führt mit der Zeit zu schwerwiegenden und teilweise irreversiblen Schädigungen des Nerven- und Gefäßsystems, weswegen eine möglichst frühzeitige Behandlung der Krankheit von großer Bedeutung ist.

1.1.2 Langerhans-Inseln: Insulinbiosynthese und Exozytose

Das Pankreas ist ein Drüsenorgan, das aus einem endokrinen und einem exokrinen Teil besteht. Die exokrinen Zellen (98% des Parenchyms) sezernieren Verdauungsenzyme, die in das Duodenum abgegeben werden. Die Cluster von endokrinen Zellen (1-2% des Parenchyms) bilden die Langerhans-Inseln (Hedeskov et al. 1980), welche 1869 von Paul Langerhans entdeckt wurden. Ein gesunder Mensch besitzt ungefähr 1 Million Langerhans-Inseln mit einem mittleren Durchmesser von 140 μm , von denen jede einzelne wiederum aus mehreren tausend Zellen besteht (Hellman et al. 1969). Es gibt 4 Zelltypen in einer Insel: die Insulin produzierenden β -Zellen (80%), die Glukagon synthetisierenden α -Zellen (15%), die Somatostatin produzierenden δ -Zellen (3-10%) und sogenannte PP-Zellen, die Pankreatisches Polypeptid ausschütten, liegen zu ca. 1% vor (Ashcroft und Rorsman et al. 1989). Die arterielle Blutversorgung der Inseln verzweigt sich so, dass die β -Zellen zuerst erreicht werden und erst dann die anderen Zelltypen. Dadurch wird sowohl eine schnelle Antwort auf die Änderungen der Glucosekonzentration im Blut ermöglicht (Weir und Bonner-Weir et al. 1990) als auch eine Hemmung der Glukagonfreisetzung der α -Zellen durch Insulin.

Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der β -Zelle findet die Synthese des Proinsulins statt. Diese Hormonvorstufe besitzt eine A- und eine B-Kette, welche durch das C-Peptid (engl. *connecting peptide*) und Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten verbunden sind. Im Golgi-Apparat wird es in Phospholipidvesikel verpackt. Das C-Peptid wird abgespalten, verbleibt aber im Vesikel, so dass Hormon und C-Peptid im Verhältnis 1:1 freigesetzt werden (Orci et al. 1986).

Eine β -Zelle besitzt etwa 9000-13000 Insulinvesikel (Dean et al. 1973), in denen das Hormon als stabiler Zink-Insulin-Komplex bis zur Freisetzung gespeichert wird. Jeder zur Sekretion führende Reiz bewirkt unter Beteiligung des mikrotubulären Systems eine Wanderung der Vesikel an die Innenseite der

Zellmembran. Hier verschmilzt die Vesikelmembran mit der Plasmamembran und so kann der Inhalt in den perikapillären Raum entleert werden. Dieser Prozess, der dem klassischen Ablauf der regulierten Exozytose entspricht, kann nur unter einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) und die darüber vermittelte Aktivierung mehrerer Proteinkomplexe stattfinden.

1.1.3 Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion

In Abbildung 1.1.3 ist der Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion dargestellt. Im gesunden Zustand wird jede Erhöhung der Glucosekonzentration im Blut über etwa 5 mmol/l von einer Insulinfreisetzung aus dem Pankreas und einem Anstieg der Insulinkonzentration im Blut begleitet. Glucose wird von den β -Zellen aufgenommen und verstoffwechselt.

Der beim Glucoseabbau entstandene erhöhte ATP/ADP-Quotient führt zur Hemmung eines in der Plasmamembran lokalisierten ATP-empfindlichen K^+ -Kanals (K_{ATP} -Kanal) und die Reduktion des K^+ -Ausstroms verursacht eine Depolarisation der β -Zelle (Malaisse et al. 1987). Wenn das Schwellenpotential für das Öffnen spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle erreicht wird (Satin et al. 1985), kommt es zu Ca^{2+} -Einstrom und somit zu einer Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Das Ca^{2+} führt dann als *second messenger* zu einer gesteigerten Exozytose von insulinhaltigen Vesikeln (Ashcroft et al. 1990).

Die Tatsache, dass β -Zellen über GLUT-2 Transporter und Glucokinase verfügen, sorgt dafür, dass die Glycolyserate insulinunabhängig direkt proportional der Glucosekonzentration im Blut ist (Matschinsky et al. 1990).

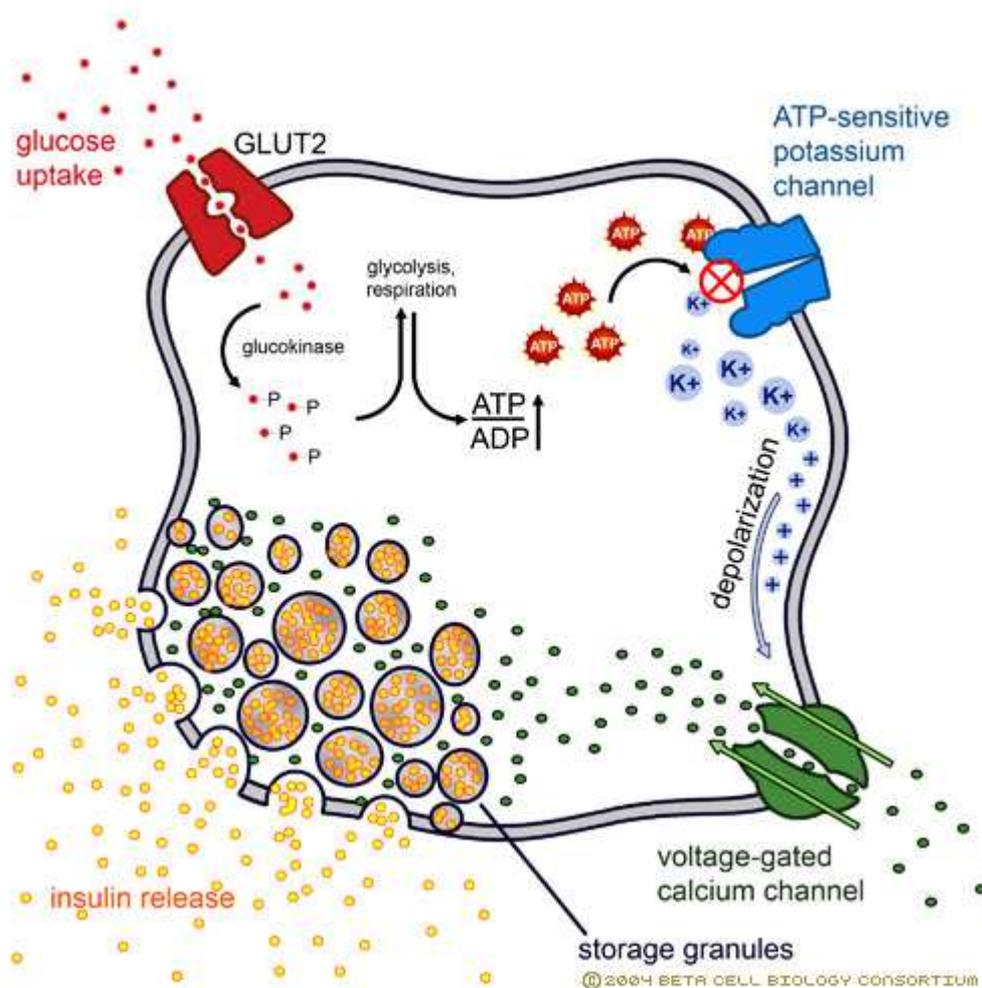


Abbildung 1.1.3 Mechanismus der Glucose-induzierten Insulinsekretion aus einer β -Zelle (Biology Consortium 2004).

Unter Glucosestimulation beobachtet man charakteristische Oszillationen von $[Ca^{2+}]_c$, die in einer Insel synchron ablaufen (Gilon et al. 1992), da alle Zellen durch *Gap Junctions* elektrisch in Verbindung stehen. Es gibt drei Phasen von $[Ca^{2+}]_c$ -Änderung (Grapengiesser et al. 1988). In Phase 0 findet ein anfänglicher Abfall von $[Ca^{2+}]_c$ statt. Die ATPasen (SERCA), die sich im endoplasmatischen Retikulum befinden, werden durch den Glucose-bedingten Anstieg der ATP-Produktion aktiviert und pumpen Ca^{2+} in das ER (Roe et al. 1994, Gylfe et al. 1989). Phase 1 ist durch einen schnellen Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$ charakterisiert und in Phase 2 sind die typischen Oszillationen zu sehen. Diese erzeugen eine pulsatile Insulinsekretion (Gilon et al. 1993).

Wie oben erwähnt, reagieren β -Zellen alle synchron auf die Glucosekonzentration im Blut. Die Insulinausschüttung erfolgt biphasisch: die erste Phase ist durch einen schnellen ca. 10-minütigen $[Ca^{2+}]_c$ -Anstieg charakterisiert, in der zweiten Phase ist eine anhaltende Freisetzung zu sehen (Curry et al. 1968). Vor allem junge, frisch synthetisierte Vesikel sind für den ersten Anstieg verantwortlich, während der zweite Anstieg eher durch ältere Vesikel aufrechterhalten wird (Michael et al. 2007). Es wurde beobachtet, dass Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eine schwache biphasische Sekretionsantwort zeigten und dass die erste Phase sogar vollständig fehlen kann (Polonsky et al. 1988 und Rorsman et al. 2000).

1.1.4 Insulinwirkung

Das Hormon besitzt eine Halbwertszeit von 7-15 Minuten. Enzyme in Leber und Niere sorgen für den Abbau von zirkulierendem Insulin. Darüber hinaus wird in den Zellen Insulin-empfindlicher Gewebe (Muskulatur, Fettgewebe und Leber) der Insulin-Insulinrezeptor-Komplex internalisiert und durch lysosomale Enzyme abgebaut. Vor dem Abbau sorgt dieser Komplex dafür, dass Glucose aufgenommen wird, indem es die GLUT-4 enthaltenden Vesikel zur Membran verlagert. Der Transporter GLUT-4 befindet sich im Muskel und im Fettgewebe und katalysiert die Glucoseaufnahme durch erleichterte Diffusion. Auf der anderen Seite besitzt die Leber wie die β -Zelle den Glucosetransporter GLUT-2, der ohne Insulin für die Glucoseaufnahme in Abhängigkeit von der extrazellulären Glucosekonzentration sorgt. Die Wirkung von Insulin an der Leber beruht auf der Förderung der Glykogenbildung und Hemmung der Gluconeogenese. Neben dem Kohlenhydratstoffwechsel beeinflusst das anabole Insulin auch den Protein- und Fettstoffwechsel, indem Aminosäuren vermehrt zur Proteinbiosynthese in die Muskelzellen aufgenommen werden und indem Triglyceride im Fettgewebe vermehrt gebildet werden.

1.1.5 Regulation der Insulinsekretion

Es gibt mehrere Verbindungen, die die Antwort der β -Zelle auf den Glucose-Reiz modulieren.

Glucose und einige Aminosäuren führen zu ATP-Bildung, welches K_{ATP} -Kanäle schließt und so eine Depolarisation der Membran und ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$ bewirken (Henquin et al. 1981). Sulfonylharnstoffe führen auch direkt zur Depolarisation, indem sie an den K_{ATP} -Kanal innerhalb der Zelle binden und ihn schließen (Ashcroft et al. 1999).

Unter Inkretineffekt, versteht man, dass die gleiche Menge Glucose oral verabreicht zu höheren Plasma-Insulin-Konzentrationen führt als bei intravenöser Gabe (Ebert et al. 1987). Enterohormone, sogenannte Inkretine (*Glucagon-like peptide-1* = GLP-1 und *Glucose dependent insulintropic peptide* = GIP), werden Glucose-abhängig nach Nahrungsaufnahme im Darm sezerniert. Diese stimulieren die Exozytose von Insulin, indem sie das Adenylatzyklase-System der β -Zelle aktivieren. Durch die Zunahme der cAMP Konzentration in der Zelle wird einerseits die Exozytose direkt unterstützt (Ämmälä et al. 1993) und weiterhin durch Phosphorylierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle eine Verlangsamung deren Inaktivierung erzeugt, so dass vermehrt Ca^{2+} einströmen kann (Britsch et al. 1995).

Ein anderer Modulator ist der Parasympathikus, dessen Neurotransmitter Acetylcholin an den M_3 -Rezeptor bindet und so die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Dieses Enzym spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), welche für die Weiterleitung von Signalen ins Zellinnere verantwortlich sind. DAG aktiviert die Proteinkinase C, die einerseits die Ca^{2+} -Sensitivität des Exozytoseprozesses beeinflusst (Arkhammar et al. 1989) und andererseits auch dafür zuständig ist, dass sich die Offenwahrscheinlichkeit der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle erhöht (Ashcroft et al. 1994). IP_3 sorgt über seine Rezeptoren am ER für einen Ca^{2+} -Ausstrom aus diesem

intrazellulären Ca^{2+} -Speicher in das Zytosol. Das durch Depolarisation und Einstrom erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_c$ steigt dadurch weiter und somit wird die Insulinsekretion verstärkt (Lemmens et al. 2001, Henquin et al. 2009).

Eine antagonistische Wirkung auf die Insulinsekretion hat zum Beispiel Glukagon, dessen Hauptwirkungsort die Leber ist. Die Adenylatzyklase wird aktiviert, dadurch wird einerseits die Glykogenolyse und die Gluconeogenese stimuliert, andererseits die Glykogenbiosynthese und Glykolyse gehemmt. Es wird bei Glucosemangel im Blut aus den α -Zellen der Langerhans-Inseln freigesetzt. Noradrenalin, Adrenalin, Somatostatin und Cortisol sind in der Lage die Insulinsekretion zu unterdrücken, indem sie unter anderem die elektrische Aktivität der β -Zelle inhibieren (Cook et al. 1982, Pace et al. 1980, Nilsson et al. 1988, Debuyser et al. 1991, Ullrich et al. 2005).

1.2 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die auf einem relativen oder absoluten Insulinmangel beruht. Ursache für absoluten Insulinmangel ist eine Autoimmunreaktion, die eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas bewirkt. Die dadurch ausgelöste Krankheit wird als Typ 1 Diabetes bezeichnet und tritt meistens in juvenilem Alter auf. Durch eine zytotoxische T-Zellreaktion wird eine Insulitis ausgelöst, welche eine Zerstörung der β -Zellen bewirkt. Aufgrund des Insulinmangels, erfahren die Organe trotz Hyperglykämie eine nicht ausreichende Energieversorgung. Dies führt dazu, dass die Leber die Gluconeogenese und Glykogenolyse aktiviert und sich eine chronische Hyperglykämie entwickelt. Der Patient ist auf eine exogene Zufuhr von Insulin angewiesen.

Der Typ 2 Diabetes beinhaltet zwei entscheidende Komponenten: eine gestörte Insulinsekretion und eine beeinträchtigte Insulinwirkung. Vermehrte Nahrungsaufnahme und Bewegungsmangel erfordern mehr

Insulinausschüttung und begünstigen die Entwicklung einer Insulinresistenz. Die Ursachen der Resistenz sind noch unklar, die Signalkaskade in der Zielzelle funktioniert nach einiger Zeit nicht mehr richtig. Wegen Veränderungen in der β -Zellfunktion und einer Abnahme der β -Zellmasse entsteht als nächstes eine verminderte Insulinsekretion; die β -Zellen sind nicht mehr in der Lage den Insulinbedarf zu kompensieren. Den Patienten wird zunächst eine konservative Therapie empfohlen, die eine Diät und körperliche Aktivität beinhaltet. Bei nicht ausreichendem Erfolg werden orale Antidiabetika eingesetzt, deren Effekte auf unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften beruhen und die der jeweiligen Patientensituation angepasst verabreicht und kombiniert werden können. Therapeutische Möglichkeiten sind Biguanide wie Metformin (Hemmung der hepatischen Glukoseproduktion), Sulfonylharnstoffe (Insulinsekretions-Steigerung), α -Glukosidasehemmer (Hemmung der Glukosidasen im Darm), Glinide (Insulinsekretionssteigerung wie Sulfonylharnstoffe), Glitazone (Verbesserung der Insulinresistenz) und Inkretinmimetika (Insulinstimulation über GLP-1). Wegen der Progredienz der Erkrankung, wird mit einer Biguanid-Monotherapie begonnen und sobald der Patient nicht mehr optimal auf das Medikament anspricht, werden mehrere Präparate kombiniert. Wenn die Kombination der oralen Antidiabetika nicht mehr ausreichend wirkt, wird mit der Insulinsubstitution begonnen.

Die durch den Diabetes mellitus verursachten Probleme betreffen nicht nur die Folgen der akuten Hyperglykämie, sondern auch die sich Jahre später manifestierenden Organschäden. Zu den wichtigsten chronischen Komplikationen zählen: Makroangiopathie (koronare Herzkrankheit) und Mikroangiopathie (vor allem an Auge, Niere und Neuronen). Durch verschiedene Interventionsstudien konnte belegt werden, dass eine normoglykämische Einstellung von Diabetikern, sowie eine Korrektur der Hyperlipidämie und der arteriellen Hypertonie zu einer fast vollständigen Unterdrückung der Diabetes-spezifischen Folgeerkrankungen führt. Aus diesem Grund ist eine gute Stoffwechseleinstellung und eine Therapie der vaskulären Risikofaktoren zu jedem Stadium der Krankheit außerordentlich wichtig.

Die Erfolge in der aktuellen Diabetestherapie sind noch nicht zufriedenstellend, da zum Teil erhebliche Nebenwirkungen auftreten können, die sowohl die Compliance des Patienten vermindern als auch zu lebensbedrohenden Zuständen führen können. Die Gruppe der Sulfonylharnstoffe zum Beispiel blockieren den K_{ATP} -Kanal und es kommt zu einer vermehrten Insulinausschüttung. Dies geschieht aber unabhängig von der Nahrungsaufnahme, was zu gefährlichen Hypoglykämien führen kann. Gewichtszunahme und gastrointestinale Beschwerden sind zusätzliche Nachteile der gegenwärtigen Therapie (Ahren et al. 2009). Die Herausforderung besteht also darin, neue Präparate zu entwickeln, die eine Aufrechterhaltung der Normoglykämie gewährleisten und weniger schwerwiegende Nebenwirkungen mit sich bringen.

1.3 Der GPR40-Rezeptor und seine Agonisten

Bei Diabetes mellitus Typ 2 tritt eine progressive Schädigung der β -Zelle auf. Im Verlauf dieser Krankheit kommt es rezidivierend zu Hyperglykämien mit zwei wichtigen Komponenten: Störungen in der Freisetzung und in der Wirkung von Insulin. Trotzdem besitzen die Zellen meistens reichlich Granula, ein Hinweis dafür, dass es sich um einen Defekt in der Stimulus-Sekretions-Kopplung handelt. Ein therapeutisches Ziel wäre also, diesen Prozess wiederherzustellen (Rorsman et al. 2005)

Die Glucosewirkung auf die β -Zelle wird durch zusätzliche Faktoren moduliert, die die Insulinsekretion optimieren. Viele davon kommen durch die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren an der Membran zustande (Ahren et al. 2009).

Einer dieser Rezeptoren ist der GPR40-Rezeptor (auch bekannt als FFA1). Dieser Rezeptor kommt in verschiedenen Membranen des Körpers vor, zum

Beispiel in Monozyten, Osteoklasten, Mammakarzinomzellen, im Gehirn, im Darm und besonders reichlich in der β -Zelle (Christiansen et al. 2010).

Briscoe et al. haben 2003 entdeckt, dass mittel- bis langkettige freie Fettsäuren diesen Rezeptor aktivieren und dass in Anwesenheit von Glucose die Insulinsekretion verstärkt wird. Durch Bindung des Liganden an $G_{\alpha q}$ wird möglicherweise die Phospholipase C aktiviert, was im Endeffekt zu einer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_c$ führt (Ahren et al. 2009).

Im Darm spielt er eine Rolle bei der Freisetzung von Inkretinhormonen. GPR40 besitzt also eine potentielle antidiabetische Aktivität, indem er direkt die Insulinfreisetzung verstärkt und indirekt die Inkretinhormonfreisetzung unterstützt. Ein Insulindefizit wird somit ohne Risiko einer iatrogen verursachten Hypoglykämie kompensiert (Christiansen et al. 2010).

Aufgrund dieser Vorteile wurden bisher eine Reihe von synthetischen GPR40 Agonisten entwickelt. Diese wurden chemisch so konstruiert, dass sie den Bindungen der Fettsäuren, die den Rezeptor am stärksten aktivieren, ähneln. In dieser Arbeit wurde mit dem Agonist TUG469 gearbeitet. Außerdem wurden auch die konjugierten Linolensäuren (CLA) 9c,11t und 10c,12t untersucht. Diese Fettsäuren kommen natürlicherweise unter anderem in Kuhmilch und in Butter vor. Obwohl mehrere CLA-Isoformen bisher identifiziert wurden, scheinen CLA 9c,11t und 10c,12t die biologisch aktivsten zu sein (Wallace et al. 2007). Auch in Menschen können CLAs durch Isomerisierung in geringen Mengen aus Linolensäure entstehen, induziert durch anaerobe mikrobielle Aktivitäten im Darm (Pariza et al. 2001).

1.4 Fragestellung

Der GPR40-Rezeptor stellt sich als interessantes Zielmolekül in der Therapie des Diabetes mellitus dar. Basierend auf den physiologischen Erkenntnissen ist es möglich, dass GPR40-Liganden über $G_{\alpha q}$ ihre Wirkung ausüben und somit zu einer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_c$ in der β -Zelle führen. Das durch Depolarisation eingeströmte Ca^{2+} wird somit durch Rezeptoraktivierung weiter erhöht. Aus dem Grund wurde mittels $[Ca^{2+}]_c$ -Messungen in den Langerhans-Inseln von Mäusen zunächst untersucht, welche Auswirkungen TUG469, CLA 9c,11t und CLA 10c,12t auf den Ca^{2+} -Haushalt der Zelle haben.

Zu klären gilt die Frage, ob $[Ca^{2+}]_c$ im Zytosol der β -Zelle nach Bindung der oben genannten Liganden an GPR40 signifikant erhöht wird. Wenn das der Fall ist, stellt sich dann die Frage, ob das bei beliebiger Glucosekonzentration stattfindet oder ob eine Mindestglucosekonzentration erforderlich ist, um eine signifikante Ca^{2+} -Erhöhung zu erzeugen. Weiterhin stellt sich die Frage, woher dieses Ca^{2+} nach Bindung der Liganden kommt, ob es allein aus dem endoplasmatischen Retikulum durch IP_3 -Bindung freigesetzt wird oder ob es eventuell andere Quellen dafür gibt. Die nächste Frage ist, ob TRP-Kanäle (*Transient Receptor Potential*) einen möglichen Beitrag zu den intrazellulären Ca^{2+} -Veränderungen nach Ligandenbindung leisten könnten, da bisher Untersuchungen zu dem Thema fehlen. Die letzte Fragestellung, mit der sich diese Arbeit beschäftigt, ist folglich diejenige, ob die Ca^{2+} -Veränderungen auch in Mäusen ohne GPR40-Rezeptor stattfinden. So wird untersucht, ob diese Liganden allein GPR40-Agonisten sind oder ob auch andere Rezeptoren auf diese reagieren.

2 Material und Methoden

2.1 Inselpräparation und Gewinnung von Inselzellclustern

2.1.1 Material

2.1.1.1 Tiere

Für die Isolierung der Langerhans-Inseln wurden männliche und weibliche Zuchtmäuse des Stamms C57Bl/6, GPR40-WT, GPR40-KO und TRPM3-KO im Alter von 3-9 Monaten verwendet. Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen bei einer konstanten Raumtemperatur von 24 °C, 55-65% relativer Luftfeuchtigkeit und einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten Standardtrockenfutter Altromin und Trinkwasser *ad libitum*.

2.1.1.2 Geräte

Brutschrank mit CO ₂ -Regler	HERAcell [®] 150, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
Kaltlichtquelle	Schott KL 1500 electronic, Schott AG, St. Gallen, CH
Präparierbesteck	
Sicherheitswerkbank Klasse 2 Typ H	HERAsafe [®] , Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, D
Stereomikroskop	Nikon, J
Trockenschrank	Heraeus [®] Function Line T 6, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Vortex-Mixer	Vortex-Genie, Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen, D

Zellkulturschalen BD Falcon TM	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Zentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, D

2.1.1.3 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien, wurden von Sigma-Aldrich, Schnellendorf/Taufkirchen, D; Roth, Karlsruhe, D; Merck, Darmstadt, D oder Merck Biosciences, Schwalbach, D bestellt.

Collagenase P aus <i>Cl. Histolyticum</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, D
0,25% Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, D
Penicillin (10000 IU/ml) Streptomycin (10 mg/ml) Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, D
Fötales Kälber Serum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe, D
RPMI 1640 mit L-GLutamin	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.1.4 Lösungen

Präparierlösung A

NaCl	135 mM
KCl	5,6 mM
MgCl ₂	1,2 mM
CaCl ₂	1,28 mM
Glucose	3 mM
HEPES	10 mM
Penicillin/Streptomycin	1% (V/V)

BSA 0,1% (m/m)

Der pH-Wert der Lösung wurde vor Zugabe des BSA mit NaOH auf 7,4 eingestellt und die Lösung bei 2-8 °C aufbewahrt.

Kollagenaselösung

5 mg Kollagenase wurden in 5 ml Präparierlösung A gelöst. 2,5 ml dieser Lösung wurden in eine Einmalspritze aufgezogen und bis zur Verwendung auf Eis gekühlt, um die Enzymaktivierung zu verhindern.

Kulturmedium

100 ml Medium enthielten folgende Bestandteile:

FKS	10% (V/V)
Penicillin/Streptomycin	1% (V/V)
RPMI 1640	ad 100 ml

2.1.2 Methoden

2.1.2.1 Präparation

Die Mäuse wurden durch CO₂ eingeschläfert, auf den Rücken gelegt und fixiert. Um möglichst keimarm zu arbeiten, wurden alle Geräte zuvor sterilisiert und der Bauchbereich mit Ethanol 70% besprüht. Das Fell im Abdomenbereich wurde dann mit Hilfe einer Schere und einer Pinzette vorsichtig durchgeschnitten, die Peritonealhöhle wurde anschließend ebenso eröffnet. Danach wurde der Ductus choledochus möglichst nah an der Leber abgeklemmt, sowie das Duodenum zu beiden Seiten der Papilla duodeni, um sicherzustellen, dass die Kollagenaselösung durch den Ductus pancreaticus ins Pankreas gelangt. Als nächstes wurde durch eine dünne Kanüle (0,40 mm x 20 mm) die Kollagenaselösung in den Ductus pancreaticus eingespritzt, wodurch sich das

Pankreas aufblähte. Nach dem Entfernen der Klemmen wurde das Organ mit Hilfe von Pinzetten vorsichtig vom Darm, von der Leber und der Milz herausgetrennt und in einem 15 ml Einmalzentrifugenröhrchen 6 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Alle 2 Minuten wurde die Probe kurz auf dem Vortex-Mischer aufgewirbelt. Auf diese Weise verdaut sich das exokrine Pankreas und man gewinnt die intakten Langerhans-Inseln befreit vom umliegenden Bindegewebe.

Die Enzymreaktion wurde mit kalter Präparierlösung A gestoppt. Nach mehrmaliger Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge wurde der Überstand jedesmal verworfen und das Pellet in Präparierlösung A resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in Petrischalen überführt und über einem Stereomikroskop wurden die Inseln mit Hilfe einer Pipette einzeln vom verdauten Gewebe getrennt. Um eine optimale Einwirkungszeit der Antibiotika zu erreichen, verblieben die Inseln (80-140 Stück) mindestens 2 Stunden in Präparierlösung A.

2.1.2.2 Gewinnung von Inselzellclustern

In einem 15 ml Einmalzentrifugenröhrchen wurden 2 ml Trypsin-haltige Lösung pipettiert, die Inseln wurden dazugegeben und 2 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Der Inselverdau wurde mit 12 ml Kulturmedium gestoppt und anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (5 Minuten, 1000 U/min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet im auf 37 °C und mit 95% O₂ / 5% CO₂ vorinkubierten Kulturmedium resuspendiert. Das Volumen war dabei abhängig von der Anzahl der Schalen und der Tropfengröße (meist 40 µl), die auf Glasplättchen aufgebracht wurden. Nach 2 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden jeder Schale 2 ml vorgewärmtes Kulturmedium hinzugefügt.

2.2 Fluoreszenzoptische Bestimmung von intrazellulärem Ca²⁺

2.2.1 Material

2.2.1.1 Geräte

Mikroskop	Axiovert 100, Carl Zeiss GmbH, Jena, D
Monochromator	Polychrome II und IV, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, D
Objektiv	PlanNeofluar 40x, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Schwingungsgedämpfter Tisch	Werkstatt Pharmazeutisches Institut, Tübingen, D
Software	IgorPro 4.0.9.1, WaveMetrics, Inc., Portland, USA; TILLvision v.4.0.1, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, D
Wärmeschrank	Hwl scientific instruments GmbH, Ammerbuch, D
Wasserbad	Werkstatt, Pharmazeutisches Institut, Tübingen, D

2.2.1.2 Chemikalien

Carbachol	Sigma Aldrich, Schnelldorf/Taufkirchen, D
D600	Sigma Aldrich, Schnelldorf/Taufkirchen, D
Fura-2-AM, cell permeant	Sigma Aldrich, Schnelldorf/Taufkirchen, D
Nifedipin	Sigma Aldrich, Schnelldorf/Taufkirchen, D
Thapsigargin	Sigma Aldrich, Schnelldorf/Taufkirchen, D

2.2.1.3 Lösungen

Badlösung: Bbad1

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	1,2 mM
CaCl ₂	2,5 mM
Glucose	0,5 mM
HEPES	10 mM

Der pH wurde auf 7,4 eingestellt mit Hilfe von NaOH. Je nach Versuchsdesign variierte die Glucosekonzentration.

Kalibrierlösung: für die Xenonlampe im Monochromator

NaCl	10 mM
KCl	148 mM
MgCl ₂	3 mM
CaCl ₂	10 mM / 0 mM
EGTA	0 mM / 10 mM
HEPES	10 mM

Der pH wurde auf 7,4 eingestellt mit Hilfe von NaOH.

Stammlösungen

Carbachol

18,2 mg Substanz wurde in 1 ml Badlösung gelöst, so entstand eine 100 mM Lösung. Kurz vor Versuchsbeginn wurde diese auf eine Endkonzentration von 1 µM verdünnt.

D600

14,63 mg Substanz wurde in 1 ml Badlösung gelöst, so entstand eine 30 mM Lösung. Kurz vor Versuchsbeginn wurde diese auf eine Endkonzentration von 3 μ M verdünnt.

Fura-2-AM

1,0 mg Substanz wurde in 400 μ l DMSO gelöst, so entstand eine 2,5 mM Lösung. Die Zellen wurden mit 5 μ M Fura-2-AM für 35 Minuten unter Lichtausschluss bei 37 °C inkubiert.

Nifedipin

3,46 mg Substanz wurde in 1 ml DMSO gelöst, so entstand eine 10 mM Lösung. Kurz vor Versuchsbeginn wurde diese auf eine Endkonzentration von 10 μ M verdünnt.

Thapsigargin

0,5 mg Substanz wurde in 0,768 ml DMSO gelöst, so entstand eine 1 μ M Lösung, die für Vorinkubation für 35 Minuten zusammen mit Fura-2-AM angewendet wurde.

2.2.2 Methode

2.2.2.1 Messprinzip

Die Kalzium-Konzentration im Zytosol der β -Zelle $[Ca^{2+}]_c$ wurde durch eine fluoreszenzoptische Methode nach Grynkiewicz et al. (1985) gemessen. Die Zellen wurden in einer 15 mM Glucoselösung bei 37 °C für 35 Minuten mit der Substanz Fura-2-AM vorinkubiert. Fura-2-AM ist ein membrangängiger Ca^{2+} -Chelator mit Fluoreszenzeigenschaften. Sobald es sich im Zytosol befindet, wird es enzymatisch verändert (zu Fura-2) und kann nicht mehr aus der Zelle

austreten. Fura-2 in freier Form wird mit einer Wellenlänge von 380 nm angeregt, während die Ca^{2+} -gebundene Form mit einer Wellenlänge von 340 nm angeregt wird. Das Emissionsmaximum liegt in beiden Fällen bei ca. 515 nm. Es gibt einen ständigen Wechsel zwischen den beiden Anregungswellenlängen und aus dem Quotient der Emissionslichtstärke kann man indirekt $[\text{Ca}^{2+}]_c$ bestimmen. Die Umrechnung der Fluoreszenzintensitäten in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ erfolgte anhand einer *in vitro* Kalibrierung mit dem Kaliumsalz von Fura-2 (Grynkiewicz et al. 1985).

2.2.2.2 Aufbau der Messanlage

Als Lichtquelle zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 wurde eine Xenonlampe benutzt und mit Hilfe des Monochromators durch ein digital steuerbares Gitter bestimmte Wellenlängen (340 nm oder 380 nm) isoliert. Diese gelangten mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels in die Messkammer, wo sich die auf lichtdurchlässigen Glasplättchen festgewachsenen Zellen befanden. Die Messkammer wurde während der Messung kontinuierlich mit Bbad1 unter Zusatz der verschiedenen Testsubstanzen bei 37 °C umspült. Die Zellen emittierten dann das Fluoreszenzlicht, welches, nach dem es einen Emissionsfilter (>515 nm) passiert hatte, die Augen des Betrachters und eine hochauflösende CCD-Videokamera erreichte. Die Fluoreszenzintensität pro Fläche wurde aufgenommen und zur Ermittlung der Intensität erfasst. Mit Hilfe einer Software IgorPro 4.0.9.1 von WaveMetrics wurden die Emissionslicht-Werte danach ausgewertet.

2.3 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Für jede Versuchsserie wurden Inseln aus Pankreata von mindestens 3 verschiedenen Mauspräparationen benutzt. Die Auswertungen erfolgten computergestützt und für die angegebene Anzahl an Experimenten wurden die entsprechende Mittelwerte und die Standardabweichungen angegeben. Zur

Auswertung wurde zunächst die Area under the curve (AUC) herangezogen. Es wurde die AUC der Kontrolle gegenüber der AUC unter Substanzgabe, jeweils während einer gleichgroßen Zeitspanne ermittelt. Wegen Ausbleichens des Farbstoffes, kommt es zu einem Drift. Aus diesem Grund wurde der Mittelwert von $[Ca^{2+}]_c$ der Kontrolle und nach Substanzgabe jeweils während eines gleich großen Zeitraums ermittelt.

Um zu analysieren, ob die Mittelwertunterschiede eine statistische Signifikanz besitzen, wurde ein gepaarter/ungepaarter Student's t-Test verwendet. Ein $p \leq 0,05$ wurde als signifikant unterschiedlich betrachtet und in Abbildungen mit * markiert, $p \leq 0,01$ mit ** und $p \leq 0,001$ mit ***. Sind die Ergebnisse nicht signifikant, wurde kein Symbol hinzugefügt.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von TUG469 auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in β -Zellen von GPR40 Wildtyp-Mäusen und C57Bl/6.

Zunächst wurden geeignete β -Zellen ausgesucht, wobei auf die Form und auf die physiologischen Oszillationen des zytosolischen Ca^{2+} unter 15 mM Glucoselösung geachtet wurde. Als nächstes wurde während des Experiments die Lösung mit der Substanz TUG469 in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt, um den akuten Einfluss auf $[\text{Ca}^{2+}]_c$ der Zellen zu untersuchen. Danach wurde die Substanz entzogen und somit überprüft, ob der Substanzeffekt in einem bestimmten Zeitrahmen auswaschbar ist. Als letztes wurde entweder eine 0,5 mM Glucoselösung oder ein Ca^{2+} -Antagonist (D600) dazugegeben, um die Oszillationen zu stoppen und so basale $[\text{Ca}^{2+}]_c$ zu bestimmen.

Im ersten Experiment wurde eine TUG469-Konzentration von 10 μM als Ausgangskonzentration verwendet. Die horizontalen Balken über der Beispielkurve zeigen an, zu welchem Zeitpunkt welche Lösungen oder Substanzen verwendet wurden.

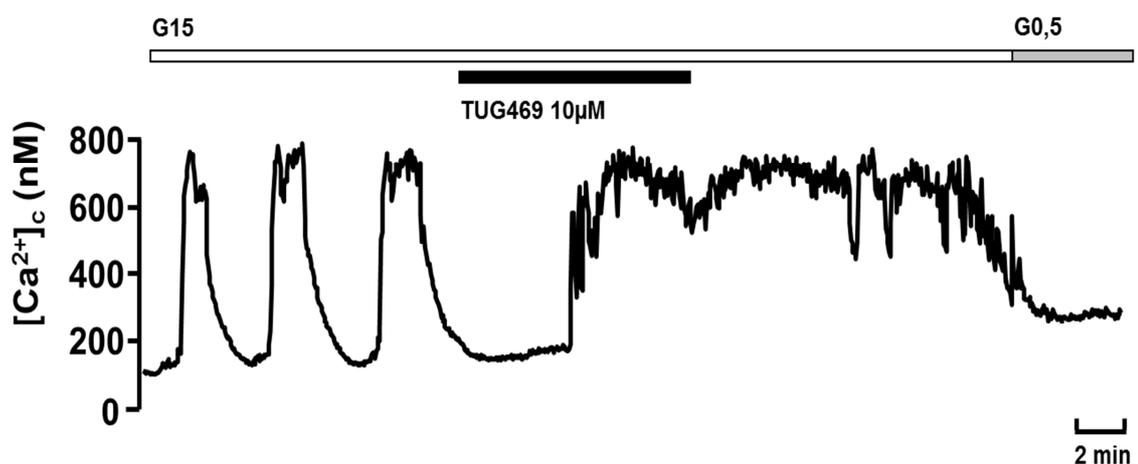


Abbildung 3.1.1 Einfluss von TUG469 [10 μM] auf $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in einer β -Zelle aus GPR40-WT Mäusen.

Die Oszillationen stoppten in dem Moment, in dem die Substanz dazugegeben wurde (anfänglicher Hemmeffekt) und einige Minuten später stieg $[Ca^{2+}]_c$ wieder, allerdings auf ein Plateau. Der Effekt war innerhalb von 10 Minuten nach Substanzentzug nicht auswaschbar. (Abbildung 3.1.1).

Um den anfänglichen Hemmeffekt von TUG469 $[10 \mu M]$ zu umgehen, wurde in diesem ersten Experiment zur Auswertung eine Zeitspanne von 5 Minuten gewählt: der $[Ca^{2+}]_c$ -Mittelwert der letzten 5 Minuten der Kontrolle und der letzten 5 Minuten des Substanzintervalls. In Abbildung 3.1.2 ist dargestellt, dass TUG469 $[10 \mu M]$ $[Ca^{2+}]_c$ signifikant erhöhte (der Mittelwert stieg von 280 ± 31 nM auf 355 ± 27 nM; $n=17$; $p \leq 0,05$).

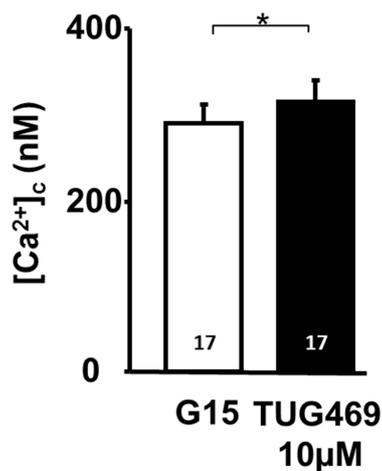


Abbildung 3.1.2 $[Ca^{2+}]_c$ in 15 mM Glucose unter TUG469 $[10 \mu M]$ in den β -Zellen aus GPR40-WT Mäusen.

Danach wurde das gleiche Experiment durchgeführt, nur die TUG469 Konzentration wurde geändert und zwar diesmal auf $1 \mu M$. In Abbildung 3.1.3 ist eine entsprechende Ca^{2+} -Kurve zu sehen.

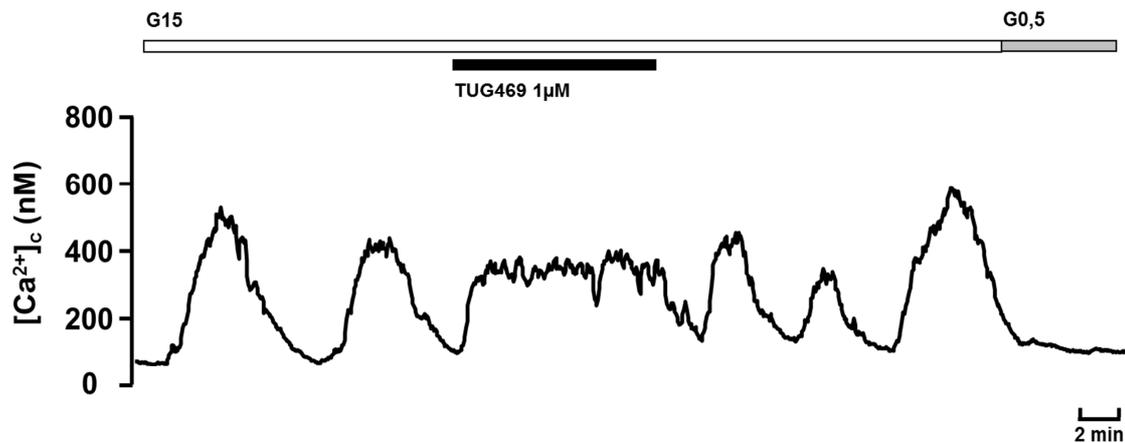


Abbildung 3.1.3 Einfluss von TUG469 [1 μM] auf $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in einer β -Zelle aus C57Bl/6 Mäusen.

Bei dieser Konzentration konnte kein anfänglicher Hemmeffekt beobachtet werden. TUG469 erhöhte gleich nach Zugabe $[\text{Ca}^{2+}]_c$ und dieses erreichte ein Plateau. Der Effekt war schnell wieder auswaschbar. Für die Auswertung dieses und aller Experimente die folgten, wurde der Mittelwert von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ermittelt. Es wurde eine Zeitspanne von 10 Minuten gewählt und zwar die letzten 10 Minuten der Kontrollphase und die letzten 10 Minuten des Substanzintervalls (was der Substanzzugabezeit ungefähr entsprach). In Abbildung 3.1.4 ist zu erkennen, dass TUG469 [1 μM] $[\text{Ca}^{2+}]_c$ signifikant erhöhte (der Mittelwert stieg von 178 ± 13 nM auf 252 ± 15 nM; $n=11$; $p \leq 0,001$).

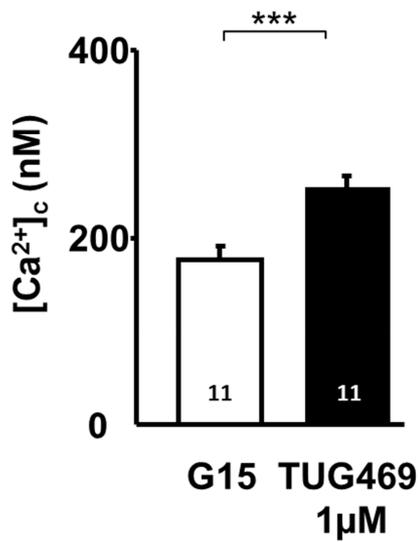


Abbildung 3.1.4 [Ca²⁺]_c-MW in 15 mM Glucose unter TUG469 [1µM] in den β-Zellen aus C57Bl/6 Mäusen.

Als nächstes wurde TUG469 in einer Konzentration von 100 nM untersucht. In Abbildung 3.1.5 ist eine entsprechende Ca²⁺-Kurve illustriert.

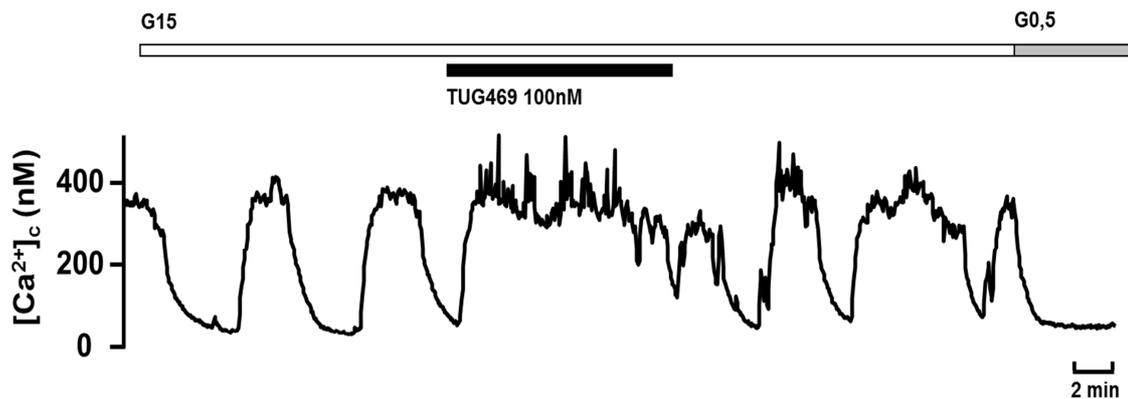


Abbildung 3.1.5 Einfluss von TUG469 [100 nM] auf [Ca²⁺]_c in einer β-Zelle aus C57Bl/6 Mäusen.

Gleich nach der TUG469 Zugabe folgte in diesem Fall eine Plateauphase, die nach Auswaschen wieder in Oszillationen überging. Eine 10-minütige Zeitspanne wurde jeweils für die Auswertung verwendet und das Ergebnis ist in Abbildung 3.1.6 zu sehen. TUG469 [100 nM] erhöhte $[Ca^{2+}]_c$ signifikant (der Mittelwert stieg von 215 ± 9 nM auf 284 ± 17 nM; $n=11$; $p \leq 0,01$).

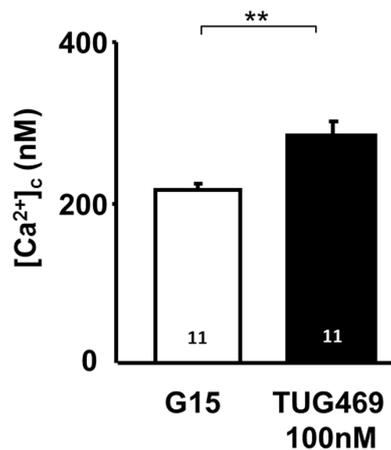


Abbildung 3.1.6 $[Ca^{2+}]_c$ in 15 mM Glucose unter TUG469 [100 nM] in den β -Zellen aus C57Bl/6 Mäusen.

Um noch eine niedrigere Konzentration zu testen, wurde TUG469 auch in der Konzentration von 10nM untersucht. In Abbildung 3.1.7 ist eine entsprechende Ca^{2+} -Kurve illustriert.

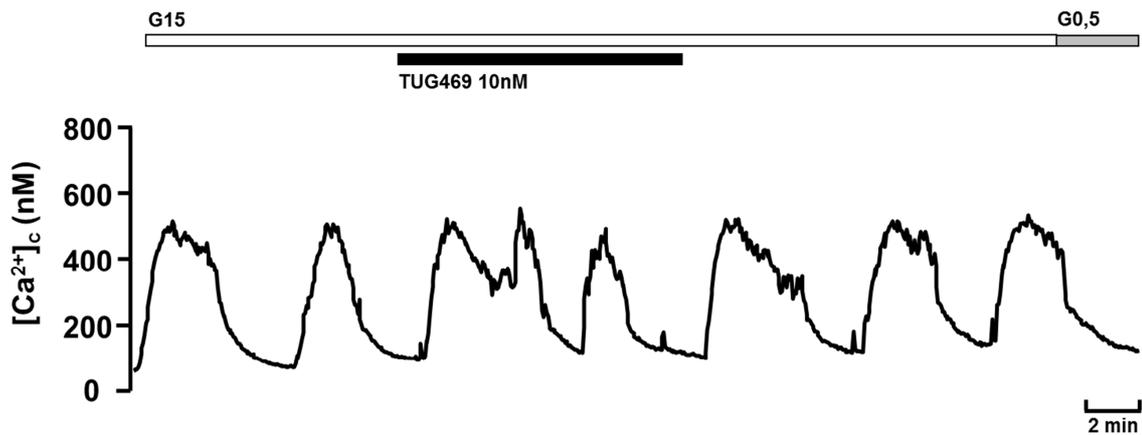


Abbildung 3.1.7 Einfluss von TUG469 [10 nM] auf $[Ca^{2+}]_c$ in einer β -Zelle aus C57Bl/6 Mäusen.

Wie in Abbildung 3.1.8 dargestellt ist, konnte TUG469 [10 nM] $[Ca^{2+}]_c$ signifikant erhöhen (der Mittelwert stieg von 225 ± 20 nM auf 304 ± 21 nM; $n=12$; $p \leq 0,01$). Allerdings ist in Abbildung 3.1.7 die Plateauphase nicht mehr so eindeutig zu erkennen und die Zellen oszillierten zum Teil weiter. Aus diesem Grund wurde die Konzentration von 100nM als Standardkonzentration für die weiteren Ca^{2+} -Messungen mit TUG469 gewählt.

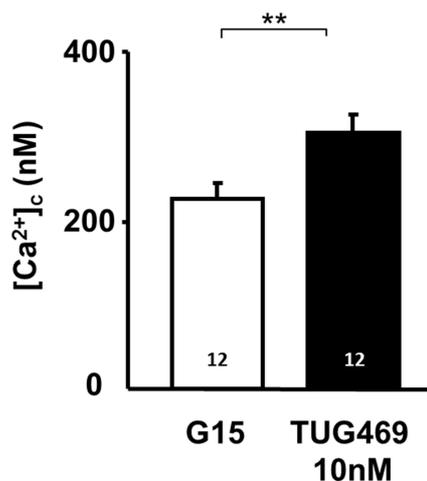


Abbildung 3.1.8 $[Ca^{2+}]_c$ in 15 mM Glucose unter TUG469 [10 nM] in den β -Zellen aus C57Bl/6 Mäusen.

Bei 5 mM Glucose (G5) war die Zelle nicht stimuliert und es stellte sich die Frage, ob TUG469 es schafft unter Schwellenbedingungen $[Ca^{2+}]_c$ zu erhöhen. In Abbildung 3.1.9 ist für eine Beispielkurve illustriert, dass unter TUG469 der Schwellenwert erreicht wurde und es entstanden Ca^{2+} -Oszillationen ($n=9$).

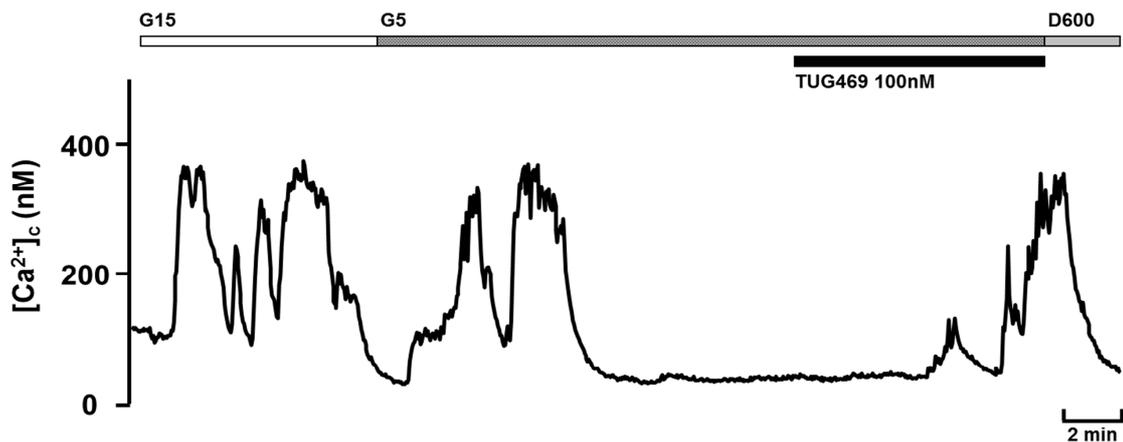


Abbildung 3.1.9 Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$ durch TUG469 [100 nM] an der Glucose-Schwellenkonzentration [5 mM] in einer β -Zelle aus GPR40-WT Mäusen.

Der nächste Schritt war zu untersuchen, was die Ca^{2+} -Erhöhung unter TUG469 bedingt. Es gibt 2 Möglichkeiten: eine Freisetzung aus intrazellulären Speichern und/oder Einstrom aus dem extrazellulären Raum über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle. Als erstes wurden die β -Zellen mit Thapsigargin vorinkubiert, ein irreversibler Hemmstoff der Ca^{2+} -Pumpe SERCA (engl. *sarco-/ endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*), um die intrazellulären Speicher zu entleeren. Der Versuch wurde sonst wie oben beschrieben durchgeführt und in Abbildung 3.1.10 ist eine entsprechende Ca^{2+} -Kurve zu sehen. Der Effekt war in 9 von 14 Experimenten zu beobachten und in den restlichen 5 blieb er aus. Dies könnte daran liegen, dass in manchen Zellen G5 so stark hyperpolarisiert, dass keine Aktivierung mehr möglich ist.

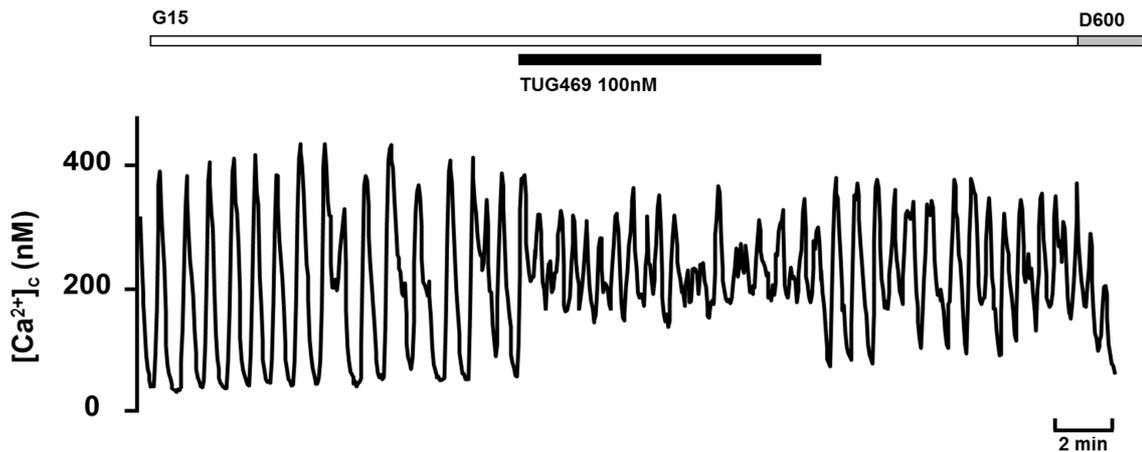


Abbildung 3.1.10 Einfluss von TUG469 [100 nM] auf $[Ca^{2+}]_c$ nach Vorinkubation mit Thapsigargin [1 μ M] in einer β -Zelle aus GPR40-WT Mäusen.

Dargestellt sind die typischen schnellen Ca^{2+} -Oszillationen unter Thapsigargin und eine Musterveränderung im Moment der TUG469-Zugabe. Wie in Abbildung 3.1.11 zu erkennen ist, konnte eine signifikante Erhöhung von $[Ca^{2+}]_c$ trotz vorheriger Entleerung der intrazellulären Speicher festgestellt werden (der Mittelwert stieg von 194 ± 17 nM auf 261 ± 24 nM; $n=13$; $p \leq 0,001$, siehe Abbildung 3.1.11).

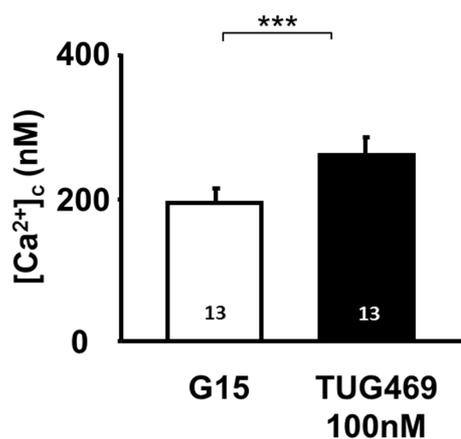


Abbildung 3.1.11 $[Ca^{2+}]_c$ in 15 mM Glucose unter TUG469 [100 nM] nach Thapsigarginvorinkubation [1 μ M] in den β -Zellen aus GPR40-WT Mäusen.

Als nächstes wurde ein anderer Weg gewählt, um die Rolle der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher nach der TUG469 Zugabe zu untersuchen. Zuerst wurde zu den physiologischen Ca^{2+} -Oszillationen unter 15 mM Glucoselösung Nifedipin dazugegeben (ein L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Blocker). So wurde der Ca^{2+} -Einstrom von außen verhindert. Wie in Abbildung 3.1.12 illustriert ist, sank $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nach Nifedipin-Zugabe auf ein basales Niveau.

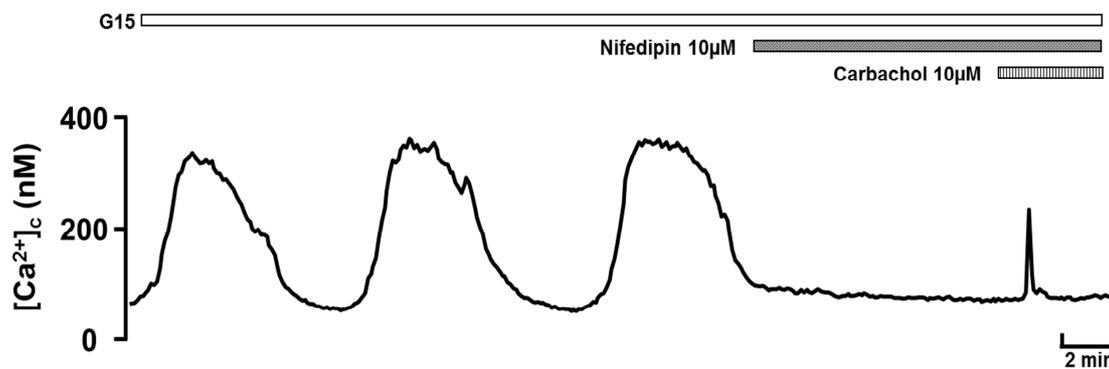


Abbildung 3.1.12 Veränderung von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nach Zugabe von Nifedipin [10 μM] und Carbachol [10 μM] in einer β -Zelle aus C57Bl/6 Mäusen.

Dann wurde Carbachol hinzugefügt. Diese Substanz entleert die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, indem Phospholipase C aktiviert wird, weshalb ein Peak von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ zu sehen ist. Danach wurde das selbe Experiment mit TUG469 durchgeführt, um herauszufinden, ob sich die freigesetzte Menge an Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern ändert. In Abbildung 3.1.13 ist ein Peak von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nach Applikation von Carbachol dargestellt.

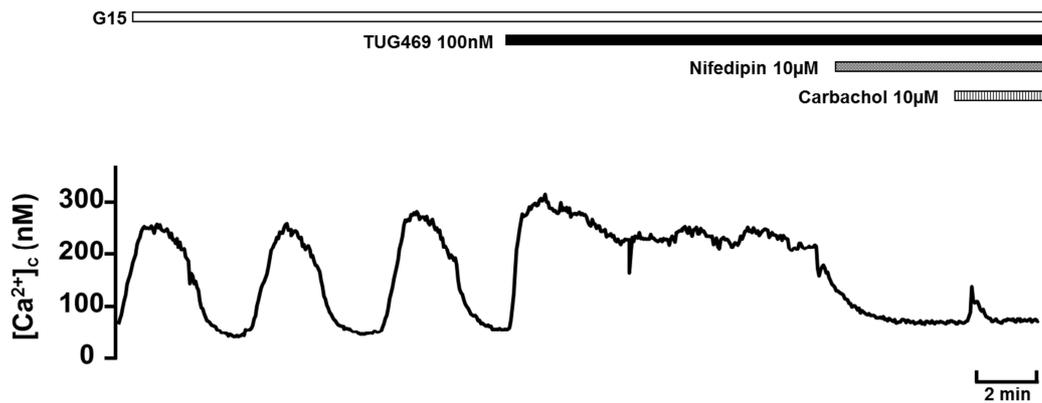


Abbildung 3.1.13 Anstieg von $[Ca^{2+}]_c$ nach Zugabe von TUG469 [100 nM], Nifedipin [10 μ M] und Carbachol [10 μ M] in den β -Zellen aus C57Bl/6 Mäusen.

Allerdings ist der Peak kleiner und wie in Abbildung 3.1.14 zu erkennen ist, ist der Carbachol-induzierte Peak von $[Ca^{2+}]_c$ unter TUG469 signifikant niedriger als ohne TUG469. Der Mittelwert verringerte sich von 178 ± 31 nM auf 112 ± 20 nM; $n=11, 18$; $p \leq 0,05$.

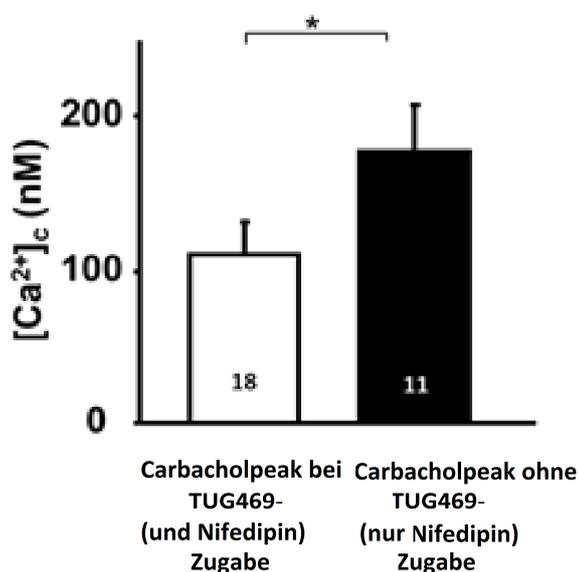


Abbildung 3.1.14 Carbachol-induzierter Peak von $[Ca^{2+}]_c$ in 15 mM Glucose und Nifedipin [10 μ M] mit und ohne TUG469 [100 nM] in den β -Zellen aus C57Bl/6 Mäusen.

Um zu untersuchen, ob der TRPM3-Kanal (Kanal für divalente Ionen wie Ca^{2+}) eine Rolle für erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_c$ unter TUG469 spielt, wurden die β -Zellen im nächsten Experiment mit dem TRPM3-Kanalblocker Mefenaminsäure (Klose et al. 2011) 1 Stunde vorinkubiert. Dann wurde TUG469 [100 nM] hinzugefügt. Wie in Abbildung 3.1.16 illustriert ist, erhöhte TUG469 [100 nM] $[\text{Ca}^{2+}]_c$ signifikant (der Mittelwert stieg von 182 ± 8 nM auf 245 ± 9 nM; $n=20$; $p \leq 0,001$). Allerdings ist in Abbildung 3.1.15 die Plateauphase nicht mehr so eindeutig zu sehen und die Zellen oszillierten zum Teil weiter.

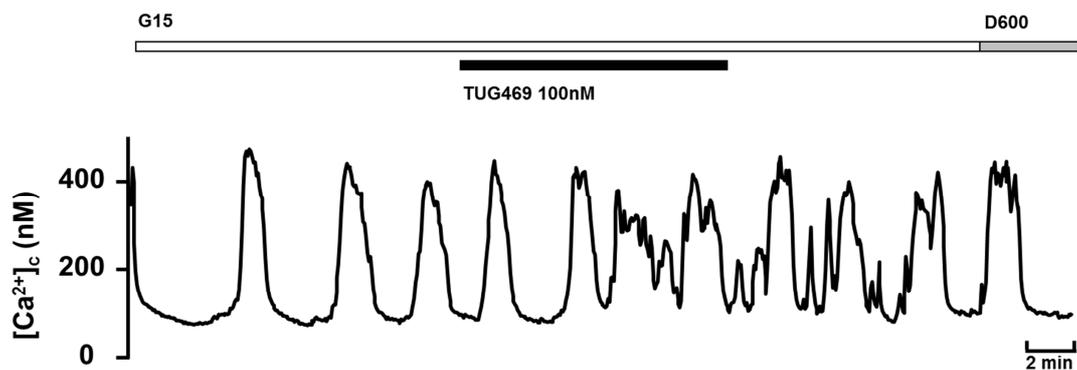


Abbildung 3.1.15 Einfluss von TUG469 [100 μM] auf $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nach Vorinkubation mit Mefenaminsäure [30 μM] in einer β -Zelle aus C57Bl/6 Mäusen.

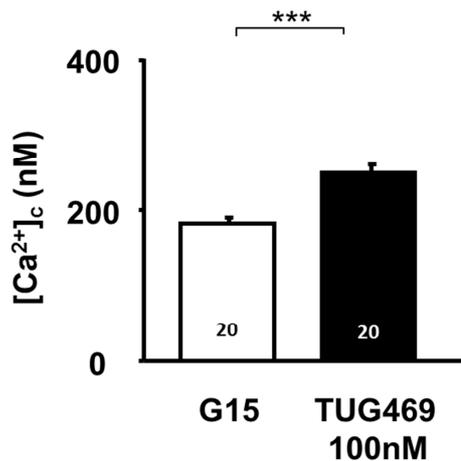


Abbildung 3.1.16 [Ca²⁺]_c in 15 mM Glucose unter TUG469 [100 nM] nach Mefenaminsäurevorinkubation [30 µM] in den β-Zellen aus C57Bl/6 Mäusen.

3.2 Einfluss von TUG469 auf die zytosolische Ca²⁺-Konzentration in β-Zellen von GPR40 Knockout-Mäusen.

Nun wurden weitere Versuche mit Langerhans-Inseln von GPR40-KO-Mäusen (KO) durchgeführt, bei welchen der GPR40-Rezeptor nicht mehr vorhanden ist. Eine Bindung mit TUG469 sollte nicht mehr möglich sein, somit konnte die Rolle dieser Substanz als Agonist des GPR40- Rezeptors überprüft werden.

Bisher wurde gezeigt, dass TUG469 [100 nM] [Ca²⁺]_c von β-Zellen der GPR40-Wildtyp-Mäuse (WT) signifikant erhöht. Im Gegensatz zu diesem stimulierenden Effekt, wurde [Ca²⁺]_c durch TUG469 im GPR40-KO nicht signifikant erhöht, wie in Abbildung 3.2.1 und 3.2.2 dargestellt ist. Der Mittelwert betrug 230±11 nM vor und 247±14 nM nach Zugabe von TUG469; n=20; p≥0,05.

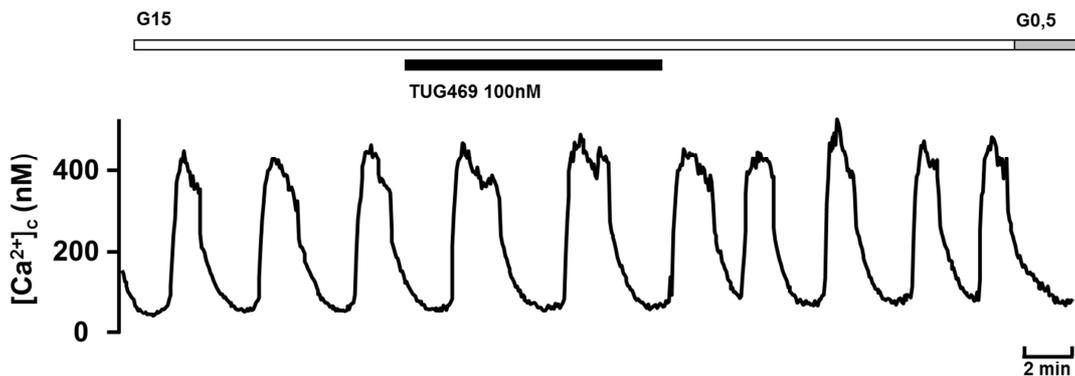


Abbildung 3.2.1 Einfluss von TUG469 [100 nM] auf $[Ca^{2+}]_c$ in einer β -Zelle aus GPR40-KO Mäusen.

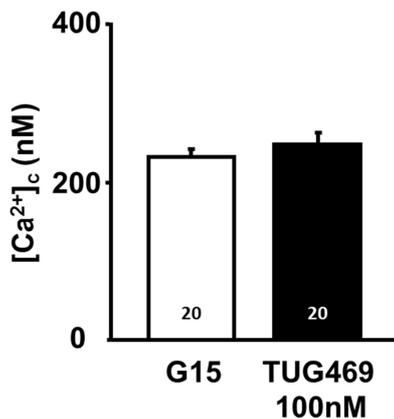


Abbildung 3.2.2 $[Ca^{2+}]_c$ in 15 mM Glucose unter TUG469 [100 nM] in den β -Zellen aus GPR40-KO Mäusen.

Als nächstes wurde der Effekt von TUG469 [100 nM] zwischen C57Bl/6 WT und GPR40-KO direkt verglichen. Es stellte sich heraus, dass ein signifikanter Unterschied von $[Ca^{2+}]_c$ unter der Substanzgabe zwischen C57Bl/6 WT und GPR40-KO erreicht werden konnte. Der Mittelwert für $[Ca^{2+}]_c$ von β -Zellen aus GPR40-KO-Mäuse lag bei 230 ± 11 nM, der Mittelwert für $[Ca^{2+}]_c$ von β -Zellen aus C57Bl/6-WT-Mäuse lag bei 284 ± 17 nM; $n=20, 11$; $p \leq 0,05$. (Abbildung 3.2.3)

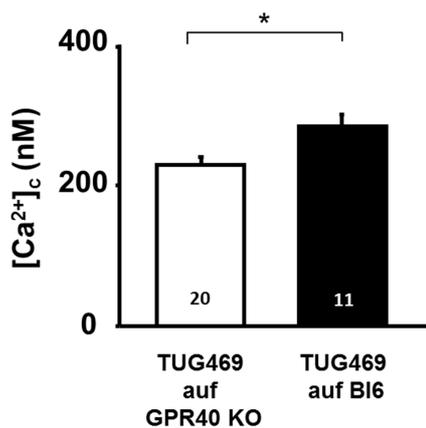


Abbildung 3.2.3 Vergleich von [Ca²⁺]_c in 15 mM Glucose unter TUG469 [100 nM] in den β -Zellen aus C57Bl/6 WT und GPR40-KO Mäusen.

Wie oben beschrieben konnte [Ca²⁺]_c durch TUG469 [100 nM] nach Mefenaminsäurevorinkubation signifikant erhöht werden. Nun sollte getestet werden, ob man diese Ergebnisse mit der TRPM3-KO Maus bestätigen kann. TUG469 erhöhte [Ca²⁺]_c signifikant bei TRPM3-KO Mäusen (Abbildung 3.2.4 und 3.2.5). Der Mittelwert stieg von 181±16 nM auf 216±15 nM; n=17; p≤0,05, Abbildung 3.2.5.

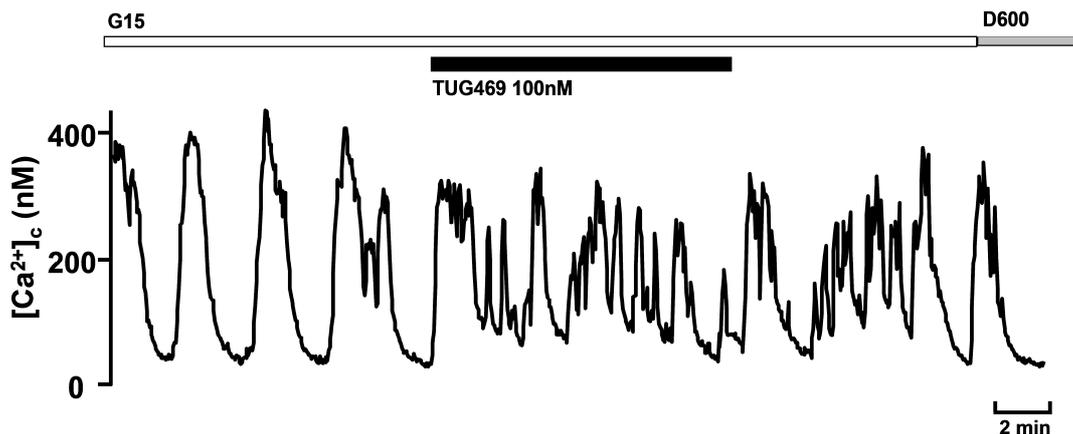


Abbildung 3.2.4 Einfluss von TUG469 [100 nM] auf [Ca²⁺]_c in einer β -Zelle aus einer TRPM3-KO Maus.

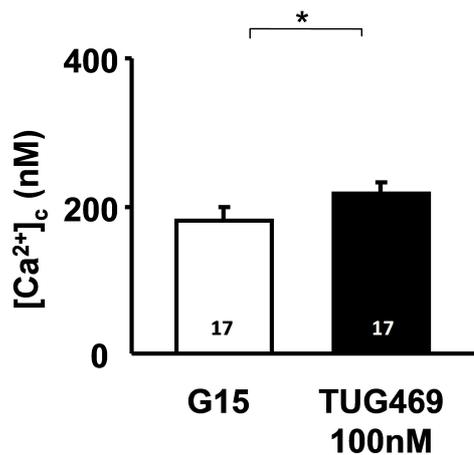


Abbildung 3.2.5 [Ca²⁺]_c in 15 mM Glucose unter TUG469 [100 nM] in den β -Zellen aus einer TRPM3-KO Maus.

Wenn man aber die TUG469 Wirkung im TRPM3-KO mit der Wirkung C57Bl/6 WT vergleicht, ist zu erkennen, dass der TUG469-induzierte Anstieg in [Ca²⁺]_c im TRPM3-KO signifikant geringer ist als im Bl6. (Abbildung 3.2.6)

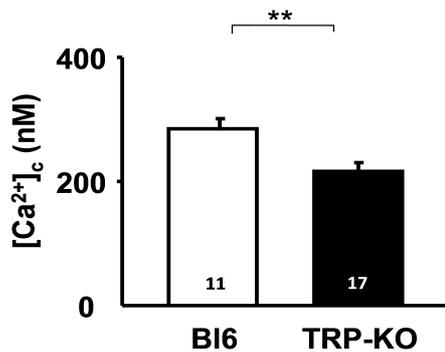


Abbildung 3.2.6 Vergleich von [Ca²⁺]_c in 15 mM Glucose unter TUG469 [100 nM] in den β -Zellen aus C57Bl/6 WT und TRPM3-KO Mäusen.

3.3 Einfluss von CLA 9/11 und CLA 10/12 auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in β -Zellen von GPR40 Wildtyp-Mäusen.

Als nächstes wurde während des Experiments die Lösung mit der Substanz CLA 9/11 oder CLA 10/12 versetzt, um den akuten Einfluss auf $[\text{Ca}^{2+}]_c$ der β -Zellen zu untersuchen. Danach wurde die Substanz entzogen und somit überprüft, ob der Substanzeffekt in einem bestimmten Zeitrahmen auswaschbar ist. Als letztes wurde entweder eine 0,5 mM Glucoselösung oder ein Ca^{2+} -Antagonist (D600) dazugegeben, um die Oszillationen abzustoppen und so die basalen Konzentrationen von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ zu bestimmen. Die Standardkonzentration von CLA 9/11 und 10/12 war 10 μM , welche in allen Experimenten verwendet wurde. Wie in den Experimenten mit TUG469, wurde der Mittelwert von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in einer Zeitspanne von 10 Minuten ermittelt.

In Abbildung 3.3.1 bis 3.3.3 ist dargestellt, dass sowohl CLA 9/11 als auch CLA 10/12 $[\text{Ca}^{2+}]_c$ der β -Zelle signifikant erhöhten. Bei CLA 9/11 stieg der Mittelwert von 255 ± 18 nM auf 442 ± 27 nM; $n=16$; $p \leq 0,001$. Bei CLA 10/12 stieg der Mittelwert von 235 ± 20 nM auf 335 ± 28 nM; $n=15$; $p \leq 0,001$.

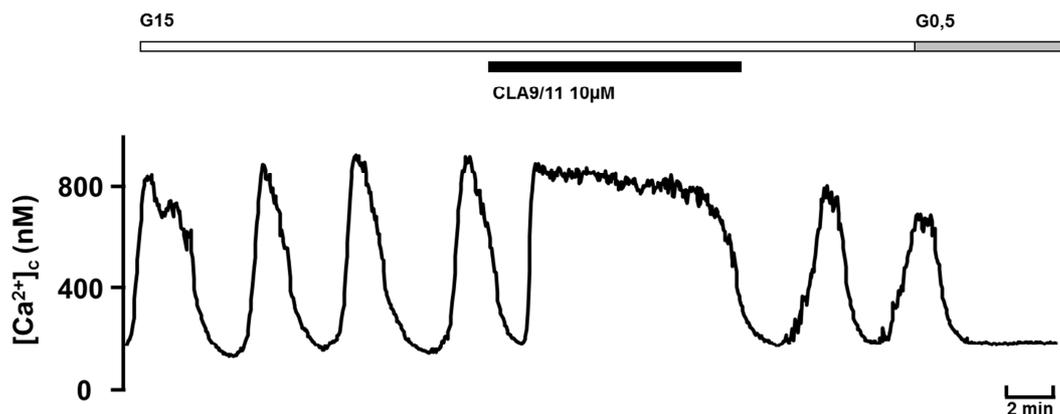


Abbildung 3.3.1 Einfluss von CLA 9/11 [10 μM] auf $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in einer β -Zelle aus GPR40-WT Mäusen.

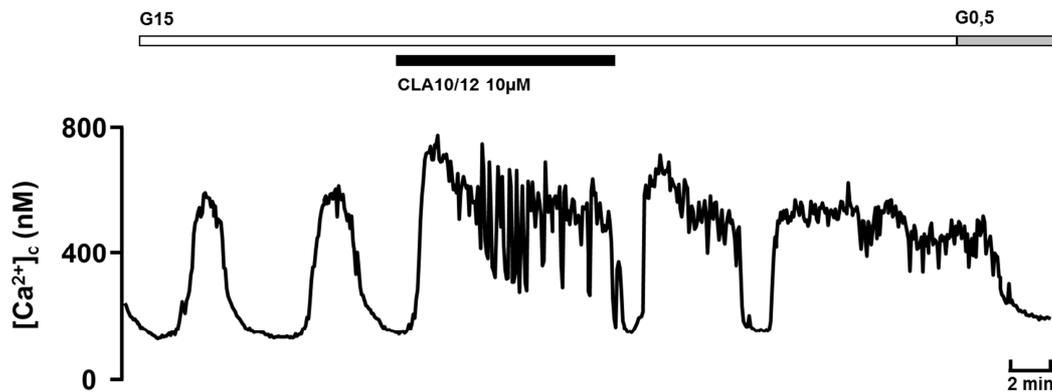


Abbildung 3.3.2 Einfluss von CLA 10/12 [10 µM] auf [Ca²⁺]_c in einer β-Zelle aus GPR40-WT Mäusen.

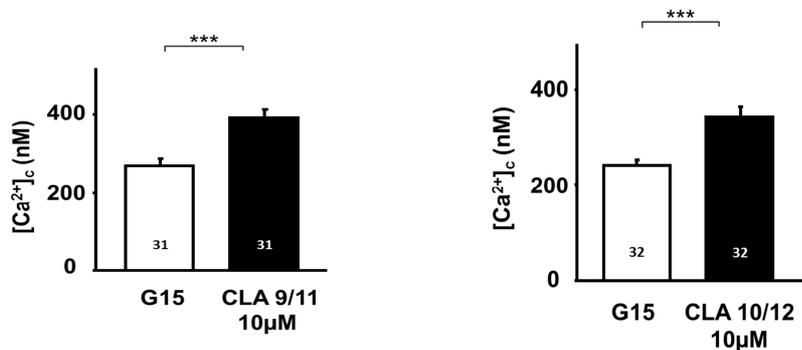


Abbildung 3.3.3 [Ca²⁺]_c in 15 mM Glucose unter CLA 9/11 [10 µM] und CLA 10/12 [10 µM] in den β-Zellen aus GPR40-WT Mäusen.

Um herausfinden zu können, ob der TRPM3-Kanal eine Rolle in der CLA-Wirkung spielt, wurde das gleiche Experiment nach 1 Stunde Vorinkubation mit Mefenaminsäure (TRPM3-Kanalblocker) durchgeführt. Es hat sich herausgestellt, dass Mefenaminsäure den CLA-Effekt kaum unterbinden konnte, da die CLAs trotz TRPM3-Kanalhemmung [Ca²⁺]_c der Zelle signifikant erhöhten (Abbildung 3.3.4 und 3.3.5). Bei CLA 9/11 stieg der Mittelwert von 168±10 nM auf 318±18 nM; n=22; p≤0,001. Bei CLA 10/12 stieg der Mittelwert von 205±10 nM auf 291±22 nM; n=21; p≤0,001 (Abbildung 3.3.6). Das zeigt,

dass die Werte nicht so hoch anstiegen wie ohne Mefenaminsäure. Außerdem ist in Abbildung 3.3.4 und 3.3.5 eine Musterveränderung zu erkennen und das typische CLA-Plateau war weder bei CLA 9/11 noch bei CLA 10/12 vorhanden.

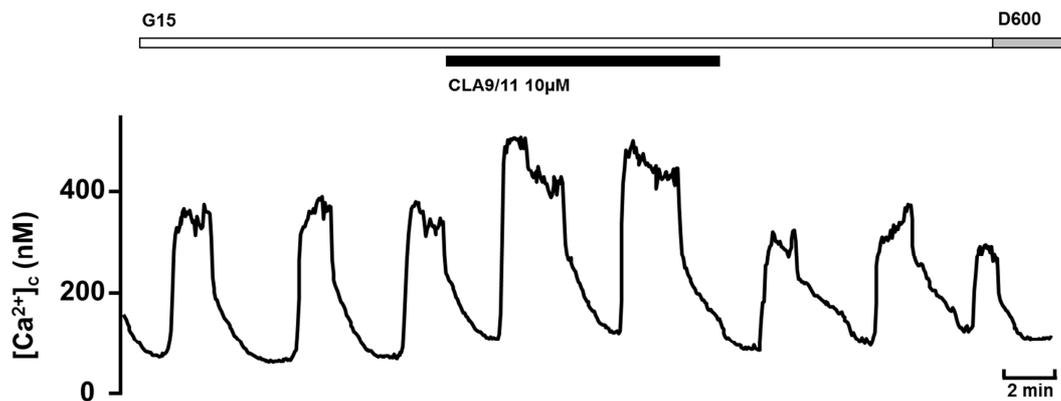


Abbildung 3.3.4 Einfluss von CLA 9/11 [10 µM] auf $[Ca^{2+}]_c$ nach Vorinkubation mit Mefenaminsäure [30 µM] in einer β -Zelle aus GPR40-WT Mäusen.

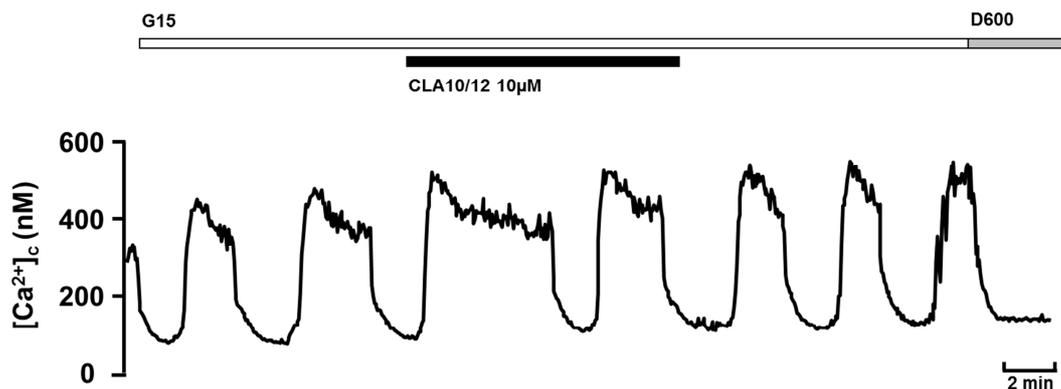


Abbildung 3.3.5 Einfluss von CLA 10/12 [10 µM] auf $[Ca^{2+}]_c$ nach Vorinkubation mit Mefenaminsäure [30 µM] in einer β -Zelle aus GPR40-WT Mäusen.

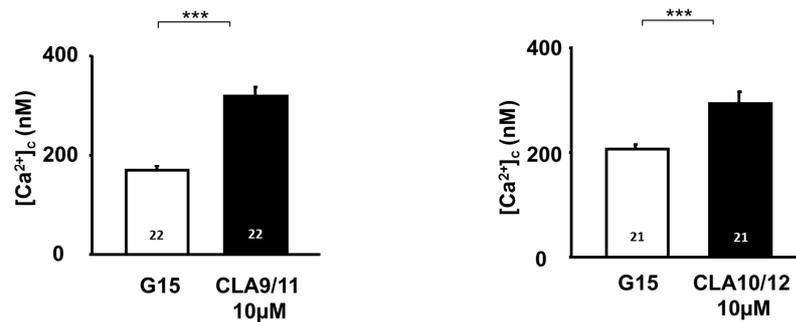


Abbildung 3.3.6 [Ca²⁺]_c in 15 mM Glucose unter CLA 9/11 [10 µM] und CLA 10/12 [10 µM] nach Mefenaminsäurevorinkubation [30 µM] in den β-Zellen aus GPR40-WT Mäusen.

3.4 Einfluss von CLA 9/11 und CLA 10/12 auf die zytosolische Ca²⁺-Konzentration von GPR40 Knockout-Mäuse.

Nun wurden weitere Versuche mit Langerhans-Inseln von GPR40-KO-Mäusen durchgeführt, bei welchen der GPR40-Rezeptor nicht mehr vorhanden ist. Eine Bindung mit beiden Substanzen sollte nicht mehr möglich sein, falls diese Substanzen als Agonisten des GPR40- Rezeptors fungieren.

Bisher wurde gezeigt, dass die CLAs [Ca²⁺]_c im GPR40 WT signifikant erhöhen. Das gleiche Experiment wurde im GPR40-Knockout durchgeführt (Abbildung 3.3.7 und 3.3.8). Bei CLA 9/11 stieg der Mittelwert von 198±16 nM auf 235±22 nM; n=15; p≤0,05; die Erhöhung von [Ca²⁺]_c blieb somit signifikant (Abbildung 3.3.9). In Abbildung 3.3.7 ist auch eine minimale Musterveränderung illustriert, die auf einen Effekt der Substanz hindeutet. Bei CLA 10/12 stieg der Mittelwert nur von 219±10 nM auf 240±22 nM; n=29; p≥0,05 (Abbildung 3.3.9). In Abbildung 3.3.8 ist zu sehen, dass die Oszillationen unter Substanzgabe keine Veränderung aufwiesen.

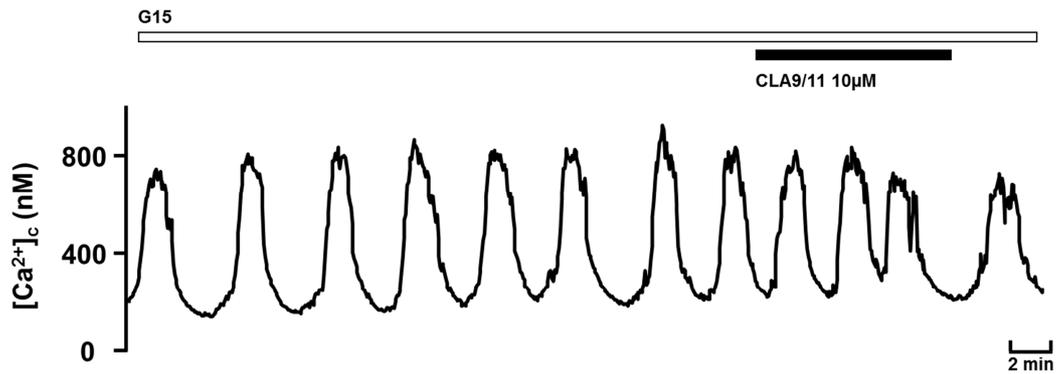


Abbildung 3.3.7 Einfluss von CLA 9/11 [10 µM] auf $[Ca^{2+}]_c$ in einer β -Zelle aus GPR40-KO Mäusen.

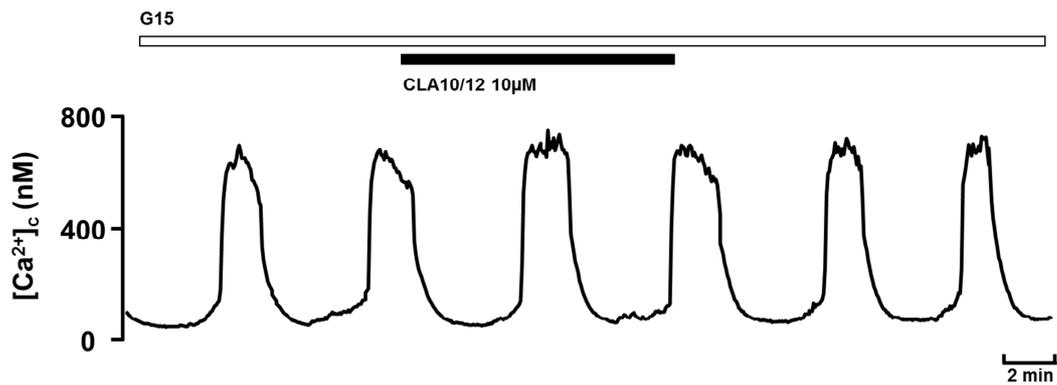


Abbildung 3.3.8 Einfluss von CLA 10/12 [10 µM] auf $[Ca^{2+}]_c$ in einer β -Zelle aus GPR40-KO Mäusen.

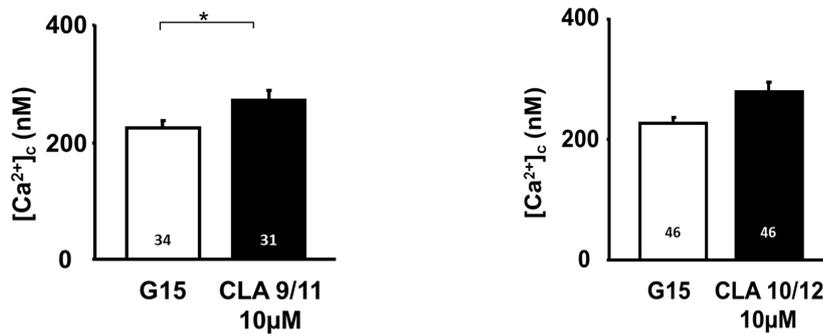


Abbildung 3.3.9 [Ca²⁺]_c in 15 mM Glucose unter CLA 9/11 [10 µM] und CLA 10/12 [10 µM] in den β-Zellen aus GPR40-KO Mäusen.

Als letztes wurde der Effekt von den CLAs [10 µM] zwischen GPR40-WT und GPR40-KO direkt verglichen. Bei CLA 9/11 stellte sich heraus, dass ein signifikanter Unterschied von [Ca²⁺]_c unter der Substanzgabe zwischen GPR40-WT und GPR40-KO erreicht werden konnte. Der Mittelwert für [Ca²⁺]_c von β-Zellen aus GPR40-KO-Mäuse lag bei 271±17 nM, der Mittelwert für [Ca²⁺]_c von β-Zellen aus GPR40-WT-Mäuse lag bei 386±24 nM; n=31; p≤0,005 (Abbildung 3.3.10).

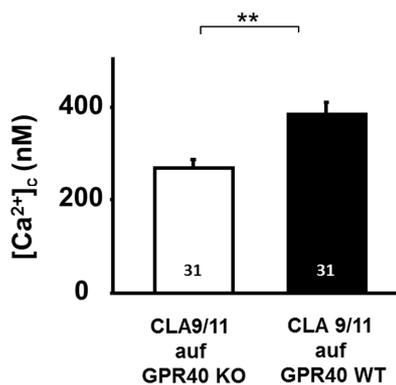


Abbildung 3.3.10 Vergleich von [Ca²⁺]_c in 15 mM Glucose unter CLA 9/11 [10 µM] in den β-Zellen aus GPR40-WT und GPR40-KO Mäusen.

Bei CLA 9/11 ergab sich ebenfalls, dass ein signifikanter Unterschied von $[Ca^{2+}]_c$ unter der Substanzgabe zwischen GPR40-WT und GPR40-KO erreicht werden konnte. Der Mittelwert für $[Ca^{2+}]_c$ von β -Zellen aus GPR40-KO-Mäuse lag bei 278 ± 15 nM, der Mittelwert für $[Ca^{2+}]_c$ von β -Zellen aus GPR40-WT-Mäuse lag bei 340 ± 20 nM; $n=46, 32$; $p \leq 0,05$, (Abbildung 3.3.11).

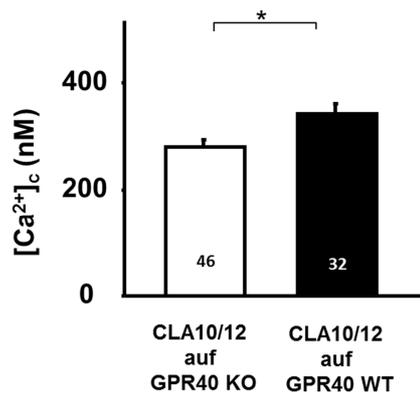


Abbildung 3.3.11 Vergleich von $[Ca^{2+}]_c$ in 15 mM Glucose unter CLA 10/12 [10 μ M] in den β -Zellen aus GPR40-WT und GPR40-KO Mäusen.

4. Diskussion

Als 2003 mittel- bis langkettige Fettsäuren als Liganden am GPR40 Rezeptor entdeckt wurden, erhöhte sich das Interesse der Forschung an dem Rezeptor wegen des potenziellen Nutzens in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. Dennoch konnten bis heute keine genaue Signalmechanismen identifiziert werden. Es ist jedoch von großer Bedeutung die Physiologie des GPR40-Rezeptors zu verstehen, um die therapeutischen Möglichkeiten auszuschöpfen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die GPR40-gekoppelten Ca^{2+} -Signalmechanismen in β -Zellen von Mäusen erforscht. Als Erstes wurde untersucht, wie sich $[\text{Ca}^{2+}]_c$ bei Anwesenheit von 15 mM Glucose nach Zugabe des Agonisten TUG469 ändert. Die Substanz wurde in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (10 nM, 100nM, 1 μM , 10 μM) und es konnte jeweils eine signifikante $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -Erhöhung nach Substanzgabe festgestellt werden. Wegen der Unempfindlichkeit von GPR40 gegenüber Pertussistoxin (Schroder et al. 2010) und der Empfindlichkeit gegenüber $\text{G}_{\alpha q}$ - und Phospholipase C Inhibitoren wurde die Theorie aufgestellt, dass GPR40 $\text{G}_{\alpha q}$ -gekoppelt sei und somit die Phospholipase C aktiviere, welche wiederum Membranphospholipide zu Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) spaltet (Latour et al. 2007). IP_3 bewirkt über seine Rezeptoren am ER einen Ca^{2+} -Ausstrom aus diesen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern in das Zytosol (Lemmens et al. 2001, Henquin et al. 2009). Dies stellt eine mögliche Erklärung für die gemessene Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nach Aktivierung des GPR40-Rezeptors durch TUG469 dar.

In Anwesenheit von Glucose wird ATP produziert, welches die K_{ATP} -Kanäle an der β -Zellmembran schließt. Die Reduktion des K^+ -Ausstromes verursacht eine Depolarisation der β -Zelle (Malaisse et al. 1987). Wenn das Schwellenpotential für das Öffnen spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle erreicht wird (Satin et al. 1985), kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom und somit zu einer Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Das Ca^{2+} ist dann als *second messenger* für die gesteigerte Exozytose

von Insulinvesikeln verantwortlich (Ashcroft et al. 1989). Der durch Depolarisation hervorgerufen $[Ca^{2+}]_c$ -Anstieg wird durch TUG469 also erhöht und dadurch sollte auch die Insulinsekretion steigen. Doshi et al. (2009) haben die Wirkung eines anderen GPR40-Agonisten (*Compound 1*) *in vivo* an Ratten untersucht. Den Ratten wurde Compound 1 oral gegeben, eine Stunde danach wurde ein Glucosetoleranztest durchgeführt und im Anschluss wurden mehrmals die Blutglucosewerte bestimmt. Tatsächlich stellte sich eine verbesserte Glucosetoleranz heraus, assoziiert mit einer Erhöhung der Insulinwerte im Plasma. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Experimente von Lin et al. (2011) *in vivo* und *in vitro* mit dem Agonist AMG 837 und später durch Tsujihata et al. (2011) *in vivo* mit dem Agonist TAK-875.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass TUG469 auch Ca^{2+} -Oszillationen hervorrufen kann, wenn die Glucosekonzentration bei 5 mM, d.h. an der Schwelle zum Auslösen von Insulinsekretion, liegt. So wie oben beschrieben entfaltete TUG469 jedoch die beste Wirkung bei 15 mM Glucosekonzentration. Fujiwara et al. (2005) konnten ebenfalls den Einfluss unterschiedlicher Glucosekonzentrationen auf $[Ca^{2+}]_c$ unter Anwendung eines Liganden des GPR40-Rezeptors (Ölsäure) zeigen. Es wurde festgestellt, dass diese Fettsäure bei 11,2 mM, 8,3 mM und 5,6 mM Glucose $[Ca^{2+}]_c$ erhöht hat, während bei 2,8 mM Glucose keine Änderung beobachtet wurde. Eine stimulatorische Glucosekonzentration muss also erreicht werden, damit die GPR40-Agonisten einen Einfluss auf die Insulinsekretion haben, was klinisch von großem Vorteil bei der Hypoglykämie-Prophylaxe wäre.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die durch TUG469 bedingte Erhöhung von $[Ca^{2+}]_c$ nur durch Freisetzung aus dem intrazellulären Speicher des ER zustande kommt oder ob es noch andere Quellen dafür gibt. Dazu wurden die Zellen mit dem irreversiblen Hemmstoff der Ca^{2+} -Pumpe SERCA (engl. *sarco-/ endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*) Thapsigargin vorinkubiert, was eine Entleerung der Speicher bewirkte. Abbildung 3.1.10 stellt die darauf erfolgende Änderung von Ca^{2+} -Oszillationen über die Zeit dar. Die durch

Thapsigargin bedingte fehlende Ca^{2+} -Aufnahmefähigkeit des Endoplasmatischen Retikulums führt zu einer höheren Frequenz von Ca^{2+} -Oszillationen (Arredouani et al. 2001). Ca^{2+} -Oszillationen werden durch die oszillatorische elektrische Aktivität in Anwesenheit von Glucose getriggert, die die Offenwahrscheinlichkeit der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle rhythmisch ändert (Gilon et al. 1999). Wie in Abbildung 3.1.11 zu erkennen ist, konnte nach Zugabe von TUG469 eine signifikante Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ trotz vorheriger Entleerung der intrazellulären Speicher festgestellt werden. Das bedeutet, dass die durch TUG469 bedingte Ca^{2+} -Erhöhung nicht hauptsächlich durch die Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher bedingt ist.

Danach sollte die vorangegangene Erkenntnis zusätzlich durch ein andersartiges Versuchsdesign überprüft werden. Nifedipin (ein L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Blocker) wurde zu der 15mM Glucoselösung dazugegeben. Wie erwartet, ist in Abbildung 3.1.12 zu sehen, dass $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nach Nifedipin-Zugabe auf ein basales Niveau sank, weil die Oszillationen allein durch das Öffnen spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle zustande kamen. Unter Glucose- und Nifedipingabe wurde Carbachol (Muskarinrezeptoragonist) hinzugefügt. Diese Substanz entleert die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, indem durch G_q die Phospholipase C aktiviert wird, weshalb ein Peak von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in der Abb.3.1.12 zu sehen ist. Danach wurde das gleiche Experiment zusätzlich mit TUG469 durchgeführt. Wie in Abbildung 3.1.14 illustriert ist, war die Konzentration an freigesetztem Ca^{2+} aus dem ER unter TUG469 signifikant geringer als ohne TUG469. Das heißt, dass TUG469 eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum bewirkt, aber dies nicht der hauptsächliche Mechanismus der Ca^{2+} -Erhöhung ist. Andererseits kann man aus dem Experiment erkennen, dass L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle eine wichtige Rolle in dem Signalmechanismus von GPR40 spielen, da unter Nifedipin die TUG469-Wirkung auf $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ausblieb. Welche Signalmechanismen dazu führen, dass sich L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle zusätzlich unter TUG469 öffnen, bleibt noch unklar.

Verschiedene TRP-Kanäle (*Transient Receptor Potential*) werden in der β -Zelle exprimiert (Akiba et al. 2004). Bei den meisten handelt es sich um nicht-selektive Kationenkanäle (Kunitoshi et al. 2011). Die Aktivierung dieser Kanäle könnte einen Beitrag zu den intrazellulären Ca^{2+} -Veränderungen leisten. In dieser Arbeit wurde mit dem TRPM3-Kanal gearbeitet, welcher durch das Neurosteroid Pregnenolonsulfat aktiviert wird (Wagner et al. 2008). Um zu untersuchen, ob der TRPM3-Kanal eine Rolle für erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_c$ unter TUG469 spielt, wurden die β -Zellen im nächsten Experiment mit dem TRPM3-Kanalblocker Mefenaminsäure (Klose et al. 2011) vorinkubiert. Nach der TUG469 Zugabe fand eine signifikante Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ trotz Blockade des Kanals statt, was gegen einen maßgeblichen Einfluss des Kanals in dem Signalmechanismus von TUG469 spricht.

Es konnte bisher gezeigt werden, dass pankreatische Inselzellen GPR40-Rezeptoren exprimieren, die durch TUG469 aktiviert werden können. In einem nächsten Versuchsansatz wurde die $[\text{Ca}^{2+}]_c$ -Änderung in β -Zellen von GPR40-Knockout Mäusen untersucht. Die gemessene Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_c$ pankreatischer β -Zellen sollte, falls sie tatsächlich durch die Aktivierung von GPR40-Rezeptoren zustande kommt, bei diesen Tieren nicht mehr vorhanden sein. Inselzellen von GPR40-KO Mäusen reagierten auf die Applikation von TUG469 mit keinerlei Erhöhung des Fura-2-Signals (Abbildung 3.2.1). TUG469 wird somit als GPR40-Agonist bestätigt, da die Substanz bei Abwesenheit des Rezeptors keine Wirkung hat. Dies wurde auch durch die Arbeitsgruppe von Latour und Alquier (2007) mit Insulinsekretionsmessungen *in vivo* und in isolierten Zellen untersucht. Sie haben gezeigt, dass keine Verstärkung der Insulinsekretion durch Fettsäuren in Anwesenheit von Glucose stattfindet, wenn der Rezeptor fehlt.

Die chronische Exposition des Organismus mit zu hohen Mengen an Fettsäuren führt zu einem Untergang der β -Zellen (Poitout et al. 2008). Die mögliche Schädigung der β -Zellen aufgrund einer GPR40 Überstimulation, führte verschiedene Arbeitsgruppen zu der Idee, dass eher GPR40 Antagonisten in

der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt werden sollten (Brownlie et al. 2008, Steneberg et al. 2005). Steneberg et al. (2005) berichteten, dass GPR40-KO Mäuse vor einer durch Hochfett-Diät induzierten Insulinresistenz und Glucoseintoleranz geschützt sind und dass eine GPR40-Überexpression in β -Zellen die Insulinsekretion beeinträchtigt. Allerdings haben neuere Studien mit GPR40-KO Mäusen (Kebede, Lan et al. 2008), transgenen Mäusen (Nagasumi et al. 2009) und GPR40-Agonisten (Doshi et al. 2009, Lin et al. 2011, Tsujihata et al. 2011) gezeigt, dass GPR40 nicht für die lipotoxischen Effekte an β -Zellen nach chronischer Fettsäureexposition verantwortlich ist. Diese Tatsache wurde außerdem von Wagner et al. 2013 *in vitro* bestätigt: während TUG469 ein Palmitat-induzierten Untergang von β -Zellen antagonisierte, konnte der GPR40-Inhibitor TUG761 den apoptotischen β -Zelluntergang nicht verhindern. Somit sind GPR40-Agonisten als mögliche Therapeutika der geeignete Weg. Der GPR40-Agonist TAK875 zum Beispiel, befindet sich in der Phase 2 einer klinischen Studie und zeigte bisher gute Wirksamkeit: TAK875 reduzierte postprandial die Blutglucosekonzentration und verminderte den HbA1c mit gleichem Erfolg wie der Sulfonylharnstoff Glimepirid, ohne gefährliche Hypoglykämien auszulösen. (Burant et al. 2013).

Konjugierte Linolensäuren (CLAs) stellen eine weitere Substanzklasse dar, anhand derer die Wirkung von GPR40-Agonisten überprüft werden sollte. CLAs sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren, welche als Stoffwechselprodukt der Linolsäure im Pansen von Wiederkäuern durch die Linolsäure-Isomerase des Bakteriums *Butyrivibrio fibrisolvens* gebildet werden. Wiederkäuerfleisch sowie Milch und Milchprodukte sind die Hauptquellen der CLAs in der Ernährung des Menschen. Das Cis-9,trans-11-Isomer ist mit über 90 % die am meisten über die Nahrung aufgenommene CLA (Kraft et al. 2001).

Zunächst wurde zu der Glucoselösung entweder CLA 9/11 (Cis-9,trans-11-Isomer) oder CLA 10/12 (Cis-10,trans-12-Isomer) hinzugegeben, um den akuten Einfluss auf $[Ca^{2+}]_c$ der β -Zellen zu untersuchen. Bei beiden Fettsäuren hat sich $[Ca^{2+}]_c$ nach Substanzgabe signifikant erhöht, was für eine Aktivierung

des GPR40-Rezeptors spricht. Eine gesteigerte Insulinsekretion nach CLA-Aufnahme wurde durch Winzell et al. 2006 mit Mäusen *in vivo* gezeigt. Außerdem wurde *in vitro* durch andere Arbeitsgruppen gezeigt, dass nicht nur $[Ca^{2+}]_c$, sondern auch die Inositoltrisphosphat-Konzentration durch die CLAs erhöht wurde, was den $G_{\alpha q}$ -Signalmechanismus bestätigt. Zusätzlich wurde der $[Ca^{2+}]_c$ -Anstieg, der durch CLAs induziert wird, unterbunden, wenn zuvor der GPR40-Rezeptor mit TUG469 aktiviert oder ein GPR40-Antagonist verabreicht wurde (Schmidt et al. 2011).

Als nächstes wurde untersucht, ob der TRPM3-Kanal-Blocker Mefenaminsäure (Klose et al. 2011) diesen Effekt beeinflusst. Mefenaminsäure konnte den CLA-induzierten Effekt auf den Ca^{2+} -Anstieg nicht unterbinden, was gegen einen Signalmechanismus durch den TRPM3-Kanal spricht.

Danach wurde der Effekt der konjugierten Linolensäuren im GPR40-KO-Modell untersucht und es hat sich herausgestellt, dass CLA 9/11 $[Ca^{2+}]_c$ der β -Zellen auch in GPR40-KO-Mäusen signifikant steigerte, jedoch $[Ca^{2+}]_c$ insgesamt geringer war als in GPR40-WT-Zellen. CLA 10/12 erzeugte eine geringe, nicht signifikante Erhöhung von $[Ca^{2+}]_c$ im KO-Modell. Schmidt et al. (2011) konnten wiederum zeigen, dass die Insulinsekretion durch CLAs im GPR40-KO-Modell sich deutlich reduziert hat im Vergleich zum WT. Dies bedeutet, dass der insulinotrope Effekt von TUG469 möglicherweise allein durch GPR40 zustande kommt, während der Effekt von CLAs durch andere zusätzliche Effekte an der β -Zelle bedingt sein könnte, die noch unbekannt sind (Schmidt et al. 2011).

Die CLAs wurden erstmals 1987 durch Pariza et al. entdeckt und wurden zuerst als antikanzerogene Substanzen identifiziert (Ha YL et al. 1987). Darauf folgend hat sich gezeigt, dass die CLAs anti-atherosklerotische und anti-adipöse Eigenschaften haben (Mitchell PL et al. 2008, Whigham LD et al. 2007). Weltweit über 1 Milliarde Menschen und 10% der Kinder leiden unter Adipositas (Haslam et al. 2005). Aus diesem Grund hat sich in den letzten Jahre das

Interesse für Gewichtsreduktionsmaßnahmen vor allem in den Industrieländern gesteigert.

CLAs als Nahrungsergänzungsmittel in Mäusen verringerte den Körperfettgehalt (Whigham LD et al. 2007), bei Menschen gibt es allerdings widersprechende Ergebnisse (Kennedy et al. 2010). Studien an Mäusen zeigten aber auch, dass CLAs die Entwicklung einer Insulinresistenz verursachen können (Poirier et al. 2006). Die negativen Effekte könnten damit verknüpft sein, dass die täglichen medikamentösen CLA-Dosen deutlich höher liegen, als die durch die Nahrung normalerweise aufgenommene Menge. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von CLAs beträgt zwischen 152 mg und 212 mg für nicht vegetarische Männer und Frauen (Ritzenthaler et al. 2001), während bei den Studien zwischen 1,5 g und 6,8 g pro Tag eingenommen wurden (Whigham et al. 2007). Denkbar ist aber trotzdem, dass diese CLAs in einer anderen Dosis therapeutisch als Antidiabetikum eingesetzt werden könnten, um die Insulinsekretion bei Defizit zu steigern und somit eine Normoglykämie zu erzeugen.

Der erwartete Anstieg der Zahl der Typ 2 Diabetiker in den nächsten Jahrzehnten und die Tatsache, dass die aktuelle Therapie nicht zufriedenstellend ist, da zum Teil erhebliche Nebenwirkungen auftreten können, die sowohl die Compliance des Patienten vermindern, als auch zu gefährlichen Komplikationen, z.B. Hypoglykämie führen können, erfordert die Entwicklung neuer Antidiabetika. Die Experimente in der vorgelegten Arbeit zeigen, dass die Aktivierung von GPR40-Rezeptoren nützlich in der Therapie des Typ 2 Diabetes sein könnte, weil es zu einer Kompensation des Insulindefizits ohne Hypoglykämierisiko führen kann. Es fehlt noch eine große Menge an Grundlagenforschung zu den genauen Signalmechanismen dieser Rezeptoren, um die dargestellten Agonisten in klinischen Studien zur therapeutischen Wirksamkeit zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Das Krankheitsbild Diabetes mellitus Typ 2 ist weltweit verbreitet. Dieses beinhaltet eine Gruppe von metabolischen Erkrankungen, deren Gemeinsamkeit eine Erhöhung der Glucose im Blut ist. Die Erfolge in der aktuellen Diabetes Therapie sind noch nicht zufriedenstellend, da zum Teil erhebliche Nebenwirkungen auftreten können, die sowohl die Compliance des Patienten vermindern als auch zu lebensbedrohenden Zuständen führen können. Die Herausforderung besteht also darin, neue Präparate zu entwickeln, die eine Aufrechterhaltung der Normoglykämie gewährleisten und weniger schwerwiegende Nebenwirkungen mit sich bringen.

Der GPR40-Rezeptor kommt besonders reichlich in der pankreatischen β -Zelle vor und stellt sich als interessantes Zielmolekül in der Therapie des Diabetes mellitus dar. Bisher konnte gezeigt werden, dass GPR40-Liganden unter Glucoseeinwirkung zu einer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_c$ führen, wodurch die physiologische $[Ca^{2+}]_c$ -Erhöhung durch Glucoseeinwirkung verstärkt wird und es zu einer vermehrten Insulinsekretion kommt. Das Risiko einer iatrogenen Hypoglykämie bestünde damit nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher zwei Substanzgruppen untersucht: TUG469, ein synthetischer GPR40-Agonist und die konjugierten Linolensäuren CLA 9/11 und CLA 10/12, natürliche Aktivatoren des Rezeptors.

Es konnte gezeigt werden, dass unter TUG469- und CLA-Zugabe die zytosolische Kalziumkonzentration signifikant erhöht wurde. Außerdem konnte keine Wirkung auf $[Ca^{2+}]_c$ durch TUG469 an GPR40-Knockout Mäusen festgestellt werden. Bei den CLAs dagegen, konnte eine signifikante Steigerung von $[Ca^{2+}]_c$ im GPR40-Knockout-Modell festgestellt werden, jedoch war die Erhöhung insgesamt geringer als im GPR40-Wildtyp. Dies bedeutet, dass der insulinotrope Effekt von TUG469 möglicherweise allein durch GPR40 zustandekommt, während der Effekt von CLAs durch andere zusätzliche Effekte an der β -Zelle bedingt sein könnte, die noch unbekannt sind.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Erhöhung von $[Ca^{2+}]_c$ durch TUG469 sowohl auf einer Mobilisierung des Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern als auch auf Ca^{2+} -Einstrom beruht.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass trotz Blockade des TRPM3-Kanals durch Mefenaminsäure eine signifikante Erhöhung von $[Ca^{2+}]_c$ stattgefunden hat. Das spricht gegen einen maßgeblichen Einfluss des Kanals in dem Signalmechanismus von TUG469 und den CLAs.

Die Experimente in der vorgelegten Arbeit zeigen, dass die Aktivierung von GPR40-Rezeptoren nützlich in der Therapie des Typ 2 Diabetes sein könnte, weil sie zu einer Kompensation des Insulindefizits ohne Hypoglykämierisiko führen kann. Es fehlt noch eine große Menge an Grundlagenforschung zu den genauen Signalmechanismen dieser Rezeptoren, um die dargestellten Agonisten in klinischen Studien zur therapeutischen Wirksamkeit zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

Ahren, B. (2009) Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Focus on diabetes*, 8, 369-85.

Akiba, Y., Kato, S., Katsube, K., Nakamura, M., Takeuchi, K., Ishii, H., Hibi, T. (2004) Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. *Biochem biophys Res Commun*, 321, 219-225.

Arkhammar, P., T. Nilsson, M. Welsh, N. Welsh & P.O. Berggren (1989) Effects of protein kinase C activation on the regulation of the stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells. *The Biochemical journal*, 264, 207-15.

Arredouani, A., J. Henquin, P. Gilon (2001) Contribution of the endoplasmic reticulum to the glucose-induced $[Ca^{2+}]_c$ response in mouse pancreatic islets. *J Physiol Endocrinol Metab*, 282, 982-91.

Ashcroft, F.M. & F.M. Gribble (1999) ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia*, 42, 903-19.

Ashcroft, F.M., P. Proks, P.A. Smith, C. Ammala, K. Bokvist (1994) Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells. *Journal of cellular biochemistry*, 55, 54-65.

Ashcroft, F.M. & P. Rorsman (1989) Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Progress in biophysics and molecular biology*, 54, 87-143.

Ämmälä, C., F.M. Ashcroft & P. Rorsman (1993) Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single beta-cells. *Nature*, 363, 356-8.

Briscoe, C.P. (2003) The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *The Journal of biological chemistry*, 278, 11303-11.

Britsch, S., P. Kripeit-Drews, F. Lang, M. Gregor & G. Drews (1995) Glukagon-like peptide-1 modulates Ca²⁺ current but not K⁺ ATP current in intact mouse pancreatic B-cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 207, 33-9.

Brownlie, R., Mayers, R., Piercer, J., Marley, A., Smith, D. (2008) The long-chain fatty acid receptor, GPR40 and glucolipototoxicity: investigations using GPR40-knockout mice. *Biochem Soc Trans*, 36, 950-4.

Burant, C. (2013) Activation of GPR40 as a therapeutic target for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 36, 175-79.

Christiansen, E. (2010) A rapid and efficient sonogashira protocol and improved synthesis of free fatty acid 1 (FFA1) receptor agonists. *The Journal of organic chemistry*, 75, 1301-4.

Cook, D.L. & E. Perara (1982) Islet electrical pacemaker response to alpha-adrenergic stimulation. *Diabetes*, 31, 985-90.

Curry, D.L., L.L. Bennett & G.M. Grodsky (1968) Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology*, 83, 572-84.

Darren J.M. (2007) Human insulin vesicle dynamics during pulsatile secretion. *Diabetes*, 56, 1277-88.

Dean, P.M. (1973) Ultrastructural morphometry of the pancreatic cell. *Diabetologia*, 9, 115-9.

Debuyser, A., G. Drews & J.C. Henquin (1991) Adrenalin inhibition of insulin release: role of the repolarization of the B-cell membrane. *Pflugers Arch*, 419, 131-7.

Doshi, L.S. (2009) Acute administration of GPR40 receptor agonist potentiates glucose-stimulated insulin secretion in vivo in the rat. *Journal of Metabolism Clinical and Experimental*, 8, 333-43.

Ebert, R. & W. Creutzfeldt (1987) Gastrointestinal peptides and insulin secretion. *Diabetes/metabolism reviews*, 3, 1-26.

Fujiwara, K. (2005) Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca^{2+} signaling in rat islet B-cells: mediation by PLC and L-type Ca^{2+} channel and link to insulin release. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 289, 670-77.

Gilon, P., A. Arreduani, P. Gailly, J. Gromada & J. Henquin (1999) Uptake and release of Ca^{2+} by the endoplasmic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic Ca^{2+} concentration triggered by Ca^{2+} influx in the electrically excitable pancreatic B-cell. *J Biol Chem*, 274, 20197-205.

Gilon, P. & J.C. Henquin (1992) Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca^{2+} concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *The Journal of biological chemistry*, 267, 20713-20.

Gilon, P., R.M. Shepherd & J.C. Henquin (1993) Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} as evidences in single pancreatic islets. *The Journal of biological chemistry*, 268, 22265-8.

Grapengiesser, E., E. Gylfe & B. Hellman (1988) Glucose-induced oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ in the pancreatic beta-cell. *Biochemical and biophysical research communications*, 151, 1299-304.

Grynkiewicz, G., M. Poenie & R.Y. Tsien (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*, 260, 3440-50.

Gylfe, E. (1989) Glucose-induced buffering of cytoplasmic Ca²⁺ in the pancreatic beta-cell - - an artifact or a physiological phenomenon? *Biochemical and biophysical research communications*, 159, 907-12.

Haslam, D., James, W. (2005) Obesity. *Lancet*, 366, 1197-209.
Kennedy, A., Martinez, K., Schmidt, S., Mandrup, S., La Point, K., McIntosh, M. (2010) Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. *J Nutr Biochem*, 21, 171-9.

Ha Y., Grimm N., Pariza, M. (1987) Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8, 1881-7.

Hedeskov, C.J. (1980) Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiological reviews*, 60, 442-509.

Hellman, B. (1969) Histology and histophysiology of the islets of Langerhans in man. *Handbook of diabetes mellitus*, ed. P. EF., 90-118. Munich: Lehmanns, V.

Henquin, J.C. (2009) Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia*, 52, 739-51.

Henquin, J.C. & H.P. Meissner (1981) Effects of amino acids on membrane potential and 86Rb⁺ fluxes in pancreatic beta-cells. *The American journal of physiology*, 240, E245-52.

Kasai, H., H. Hatakeyama, M. Ohno & N. Takahashi (2010) Exocytosis in Islet Beta-cells. *The Islets of Langerhans*, ed. M.S. Islam, 305. Adv. Exp Med Biol.

Kebede, M., Alquier, T., Latour, M., Semache, M., Tremblay, C., Poitout, V. (2008) The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding. *Diabetes*, 57, 2432-37.

Klose, C., Straub, I., Riehle, M., Ranta, F., Krautwurst, D., Ullrich, S., Meyerhof, W., Harteneck, C. (2011) Fenamates as TRP channel blockers: mefenamic acid selectively blocks TRPM3. *Br J Pharmacol*, 162, 1757-69.

Kraft, J. (2001) Konjugierte Linolensäuren: Genese und metabolische Wirkungen. *Ernährungs-Umschau*, 48, 348-54.

Kunitoshi, U., Makoto, T. (2011) The role of thermosensitive TRP (transient receptor potential) channels in insulin secretion. *Endocrine Journal*, 58, 1021-28.

Lan, H., Hoos, L., Liu, L., Tetzloff, G., Hu, W., Abbendanzo, S., Vassileva, G., Gustafson, E., Hedrick, J., Davis, H. (2008) Lack of FFAR1/GPR40 does not protect mice from high-fat diet-induced metabolic disease. *Diabetes*, 57, 2999-3006.

Latour, M., Alquier, T., Oseid, E., Tremblay, C., Jetton, T., Luo, J., Lin, D., Poitout, V. (2007) *Diabetes*, 56, 1087-94.

Lemmins, R., O. Larsson, P.O. Berggren & M.S. Islam (2001) Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum amplifies the Ca²⁺ signal mediated by activation of voltage-gated L-type Ca²⁺ channels in pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry*, 276, 9971-7.

Lin, D.C. (2011) AMG837: a novel GPR40/FFa1 agonist that enhances insulin secretion and lowers glucose levels in rodents. *PLoS ONE*, 6, 1-10.

Malaisse, W.J. & A. Sener (1987) Glucose-induced changes in cytosolic ATP content in pancreatic islets. *Biochimica et biophysica acta*, 927, 190-5.

Matschinsky, F.M. (1990) Glukokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes*, 39, 647-52.

Mitchell, P., McLeod, R. (2008) Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: studies in animal models. *Biochem Cell Biol*, 86, 293-301.

Nagasumi, K., Esaki, R., Iwachidow, K., Yasuhara, Y., Ogi, K., Tanaka, H., Nakata, M., Yano, T., Shimakawa, K., Taketomi, S., Takeuchi, K., Odaba, H., Kaisho, Y. (2009) Overexpression of GPR40 in pancreatic B-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice. *Diabetes*, 58, 1067-76.

Nilsson, T., P. Arkhammar, P. Rorsman & P.O. Berggren (1988) Inhibition of glucose-stimulated insulin release by alpha 2-adrenoreceptor activation is paralleled by both a repolarization and a reduction in cytoplasmic free Ca²⁺ concentration. *The Journal of biological chemistry*, 263, 1855-60.

Orci, L. (1986) The insulin cell: its cellular environment and how it processes (pro)insulin. *Diabetes/metabolism reviews*, 2, 71-106.

Pace, C.S. (1980) Somatostatin: control of stimulus-secretion coupling in pancreatic islet cells. *Society of General Physiologists series*, 35, 163-95.

Pariza, M., Park, Y., Cook, M. (2001) The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res*, 40, 283-98.

Poirier, H., Shapiro, J., Kim, R., Lazar, M. (2006) Nutritional supplementation with trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid induces inflammation of white adipose tissue. *Diabetes*, 55, 1634-41.

Poitout, V., Robertson R. (2008) Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev*, 29, 351-66.

Polonsky, K.S., B.D. Given, L.J. Hirsch, H. Tillil, E.T. Shapiro (1988) Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*, 318, 1231-9.

Ritzenthaler, K., McGuire, M., Falen, R., Schultz, T., Dasgupta, N., McGuire, M. (2001) Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *J Nutr*, 131, 1548-54.

Roe, M.W., R.J. Mertz, M.E. Lancaster, J.F. Worley, 3rd & I.D. Dukes (1994) Thapsigargin inhibits the glucose-induced decrease of intracellular Ca²⁺ in mouse islets of Langerhans. *The American journal of physiology*, 266, E852-62.

Rorsman, P. (2005) Insulin secretion: function and therapy of pancreatic beta-cells in diabetes. *Br J Diabetes Vasc Dis*, 5, 187-91.

Rorsman, P., L. Eliasson, E. Renstrom, J. Gromada, S. Barg (2000) The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 15, 72-77.

Satin, L.S. & D.L. Cook (1985) Voltage-gated Ca²⁺ current in pancreatic B-cells. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 404, 384-7.

Schmidt, J., Liebscher, K., Merten, N. (2011) Conjugated linoleic acids mediate insulin release through islet G protein-coupled receptor FFA1/GPR40. *J Biol Chem*, 286, 11890-94.

Schroder, K., R. Zou & J. Tschopp (2010) The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science*, 327, 296-300.

Steneberg, P., Rubins, N., Bartoov-Shifman, R., Walker, M., Edlund, H. (2005) The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab*, 1, 245-258.

Tsujihata, Y. (2011) TAK-875, an orally available G protein-coupled receptor 40 / free fatty acid receptor 1 agonist, enhances glucose-dependent insulin secretion and improves both postprandial and fasting hyperglycemia in type 2 diabetic rats. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, 339, 228-37.

Ullrich, S., S. Berchtold, F. Ranta, G. Seebohm, G. Henke (2005) Serum- and glucocorticoid- inducible kinase 1 (SGK1) mediates glucocorticoid-induced inhibition of insulin secretion. *Diabetes*, 54, 1090-9.

Wagner, R., G. Kaiser, F. Gerst, E. Christiansen, M. Due-Hansen, M. Grundmann, F. Machicao, A. Peter, E. Kostenis, T. Uwen, A. Fritsche, H. Häring, S. Ullrich (2013) Reevaluation of fatty acid receptor 1 as a drug target for the stimulations of insulin secretion in humans. *Diabetes*, 62, 2106-11.

Wagner, T., S. Loch, S. Lambert, I. Straub, S. Mannebach (2008) Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nature cell biology*, 10, 1421-30.

Wallace. R., McKain, N., Shingfield, K., Devillard, E. (2007) Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *J Lipid Res*, 48, 2247-54.

Weir, G.C. & S. Bonner-Weir (1990) Islets of Langerhans: the puzzle of inraislet interactions and their relevance to diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 85, 983-7.

Winzell, M., Pacini, G., Ahren, B. (2006) Insulin secretion after dietary supplementation with conjugated linoleic acids and n-3 polyunsaturated fatty acids in normal and insulin-resistant mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290, 347-54.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich habe alle Versuche selbst durchgeführt und in Zusammenarbeit mit Herr Prof. Dr. Krippeit-Drews konzipiert. Er hat außerdem die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Datum

Unterschrift

8. Danksagung

Voller Freude bin ich am Ende dieses Kapitels angekommen, ich habe meine Dissertation erstellt! Das war aber nicht nur mein Verdienst, sondern auch der von anderen Menschen, die mich auf diesem Weg begleitet haben. Aus diesem Grund ist es jetzt an der Zeit mich bei allen zu bedanken, die mir das ermöglicht haben.

Ich danke Frau Professorin Gisela Drews und Herr Professor Peter Krippeit-Drews, die mich in ihrem Team ganz herzlich aufgenommen haben und mich mit ihrem großartigen Fachwissen und mit hervorragender Betreuung zur Seite standen. Meinen wissenschaftlichen Kollegen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Atmosphäre im Labor.

Meinem Vater, ohne seine Unterstützung und Enthusiasmus ein Studium und eine Promotion nicht möglich gewesen wären. So gerne würde ich diesen Erfolg mit Dir feiern; danke, dass Du immer für mich da warst. Meiner Mutter für ihren liebevollen Beistand und Rückhalt. Schließlich danke ich auch meinem Ehemann, der Liebe meines Lebens, der mit seiner Ermunterung und Anerkennung mich in meiner Arbeit sehr bestärkt hat.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Dunia Graf (geb. Cornejo Diaz)
Geburtsdatum	02.12.1988
Geburtsort	San Salvador, El Salvador
Konfession	Evangelisch
Familienstand	Verheiratet

Promotion

2011 - 2015	Promotionsarbeit am Pharmazeutischen Institut in Tübingen unter Prof. Dr. Krippeit-Drews. Arbeitstitel: „Die Rolle von GPR40-Agonisten für die Funktion pankreatischer Beta-Zellen“
-------------	---

Hochschulausbildung

2008 - 2015	Medizinstudium an der Eberhard Karls Universität Tübingen
19/05/2015	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
31/03/2010	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Schulbildung

1994 - 2007	Deutsche Schule San Salvador Abschluss: International Baccalaureate Diploma, Note 1,4 (Internationales Abitur)
-------------	--