

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und  
Poliklinik Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin IV**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring**

**Die Bedeutung der spezifischen Stimulation des  
GPR40/FFAR1-Rezeptors in insulinsezernierenden  
Zellen des Pankreas**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Kathrin Ilse Liebscher  
aus  
Freiberg**

**2014**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Ullrich

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Harteneck

*Meinen geliebten Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Diabetes mellitus.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Geschichte des Diabetes mellitus .....	1
1.1.2 Klassifikation des Diabetes mellitus .....	1
1.1.3 Epidemiologie des Diabetes mellitus .....	3
1.1.4 Ätiologie und Folgen des Diabetes mellitus.....	3
<b>1.2 Insulin.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Geschichte von Insulin .....	3
1.2.2 Struktur von Insulin.....	4
1.2.3 Metabolische Wirkung von Insulin .....	4
1.2.4 Signalweg von Insulin.....	5
<b>1.3 Das endokrine Pankreas .....</b>	<b>6</b>
1.3.1 Langerhans´sche Inselzellen.....	6
1.3.2 Regulation der Betazellmasse .....	7
<b>1.4 Regulation der Insulinsekretion.....</b>	<b>8</b>
1.4.1 Glucose-abhängige Regulation der Insulinsekretion.....	8
1.4.2 FFA-abhängige Regulation der Insulinsekretion .....	11
1.4.3 Inkretin-abhängige Regulation der Insulinsekretion .....	11
1.4.4 Neuronale Regulation der Insulinsekretion .....	13
<b>1.5 GPR40/FFAR1.....</b>	<b>14</b>
1.5.1 Aufbau und Funktion von GPR40/FFAR1 .....	14
1.5.2 Agonisten und Antagonisten von GPR40/FFAR1 .....	15
1.5.3 GPR40/FFAR1 als therapeutisches Target bei Typ 2 Diabetes mellitus.....	16
<b>1.6 Wirkung der FFAs .....</b>	<b>17</b>
1.6.1 Metabolismus von FFAs in den Betazellen.....	17
1.6.2 Wirkung von FFAs auf den Glucosemetabolismus.....	17
1.6.3 Wirkung von FFAs auf die Ionenkanäle .....	18
1.6.4 Wirkung von FFAs auf die PKC .....	18
1.6.5 Wirkung von FFAs auf den Signalweg von Insulin .....	19
<b>1.7 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>19</b>

<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>21</b>
2.1.1	Mausmodelle und Zelllinien	21
2.1.2	Enzyme und zugehörige Puffer	21
2.1.3	Größenstandards	21
2.1.4	Kommerziell erworbene Kits	21
2.1.5	Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese	22
2.1.6	GPR40-Rezeptor-Liganden	22
2.1.7	Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.8	Geräte und Hilfsmittel	24
2.1.9	Verbrauchsmittel	24
<b>2.2</b>	<b>INS-1E-Zellen</b>	<b>25</b>
2.2.1	Kultivierung der INS-1E-Zellen	25
<b>2.3</b>	<b>Langerhans'schen Inselzellen der Maus</b>	<b>26</b>
2.3.1	Herstellung der vierfach konzentrierten Hanks-Lösung	26
2.3.2	Präparation, Aufreinigung und Kultivierung der Inseln	28
<b>2.4</b>	<b>Nachweis der Expression von GPR40</b>	<b>30</b>
2.4.1	Isolation von RNA	30
2.4.2	Herstellung von cDNA	30
2.4.3	Primer-Design	31
2.4.4	Polymerasekettenreaktion	32
2.4.5	Gel-Elektrophorese	33
<b>2.5</b>	<b>Inkubation der INS-1E-Zellen</b>	<b>34</b>
<b>2.6</b>	<b>Inkubation der Langerhans'schen Inselzellen der Maus</b>	<b>36</b>
<b>2.7</b>	<b>Insulinsekretion</b>	<b>37</b>
2.7.1	Insulinbestimmung	37
2.7.2	Statistik	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Expressionsnachweis von GPR40/FFAR1</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Effekte der Aktivierung von GPR40/FFAR1 auf die Insulinsekretion in insulinsezernierenden Zellen</b>	<b>41</b>
3.2.1	Fettsäure-induzierte Insulinsekretion in INS-1E-Zellen	41
3.2.2	Effekt von GW9508 auf die Insulinsekretion in INS-1E-Zellen	44
3.2.3	Effekt von BSA auf die Insulinsekretion in INS-1E-Zellen	46

3.2.4	Effekt von neuen spezifischen GPR40/FFAR1-Agonisten und -Antagonisten auf die Insulinsekretion in INS-1E-Zellen .....	48
3.2.5	Effekt verschiedener BSA-Konzentrationen auf die Insulinsekretion in INS-1E-Zellen	50
3.2.6	Effekt der Hemmung von Gi auf die Insulinsekretion in INS-1E-Zellen.....	52
3.2.7	Effekt von TUG-424 auf die Insulinsekretion in INS-1E-Zellen.....	54
<b>3.3</b>	<b>Effekte der Aktivierung von GPR40/FFAR1 auf die Insulinsekretion in isolierten Langerhans'schen Inselzellen der Maus .....</b>	<b>56</b>
3.3.1	GSIS in Langerhans'schen Inselzellen der Maus.....	56
3.3.2	Einfluss von GPR40/FFAR1 auf die Insulinsekretion in Langerhans'schen Inselzellen der Maus.....	57
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>89</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>90</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Apaf-1	Apoptotischer Protease-Aktivierungs-Faktor 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl2-assoziiertes Todespromotor
Bak	Bcl-2-homologer Antagonist/Killer
Bax	Bcl-2-assoziiertes X Protein
Bcl-2	B-Zell-Lymphom 2
Bid	BH3-interagierender Todesdomänen-Agonist
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
CGRP	Calcitonin-Gen-verwandtes Peptid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
C-Peptid	<i>Connecting peptide</i>
CREB	cAMP <i>response element</i> -Bindeprotein
Cx36	Connexin 36
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	Tod-induzierender Signalkomplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
endoG	Endonuclease G
DPP-IV	Dipeptidyl-Peptidase-IV
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Epac2	Exchange Protein aktiviert durch cAMP 2
ERK1/2	Extrazellulär-regulierte Kinase 1/2
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAF	Fettsäure-frei
FCS	Fetales Kälberserum
FFA	Freie Fettsäure
FoxO1	Forkhead-Box-Protein
GH	Wachstumshormon
GIP	Glucose-abhängiges insulinotropes Peptid
GIRK	G-Protein-gekoppelter einwärtsgerichteter Kaliumionen-Kanal
GLP-1	<i>glucagon-like peptide 1</i>
GLP-1R	<i>glucagon-like peptide 1</i> -Rezeptor
GLUT-2	Glucose-Transporter 2
GPR40	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 40

Grb2	Wachstumsfaktorrezeptor-Bindungsprotein 2
GRP	Gastrin-freisetzendes Peptid
GSIS	Glucose-stimulierte Insulinsekretion
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	<i>high-dense</i> -Lipoprotein
HNF-1/-4	Hepatozyten-nukleärer-Faktor-1/-4
Htr	<i>high temperature requirement protein</i>
IAPP	Insel-Amyloid-Polypeptid
IDE	<i>insulin degrading enzyme</i>
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
INS-1	Insulin-sezernierende Zelllinie
IP3	1,4,5-Inositoltriphosphat
IP3R	1,4,5-Inositoltriphosphat-Rezeptor
IPF-1	Insulin-Promotor-Faktor-1
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KO	<i>knock-out</i>
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
LADA	Latenter Autoimmun-Diabetes des Erwachsenen
LDL	<i>Low-dense</i> -Lipoprotein
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MODY	<i>maturity onset diabetes of the young</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
NADH <sub>2</sub>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
PACAP	Hypophysäres-Adenylatzyklase-aktivierendes Peptid
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDK1	Phosphoinosit-abhängige Serin Kinase 1
Pdx-1	Pankreas-Duodenum Homeobox-1
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
PH	Pleckstrin Homologie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI	Phosphatidylinositol
PIP2	Phosphatidylinositol-3,4-diphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Serin/Threonin Kinase B
PKC	Proteinkinase C
PKC $\delta$	Proteinkinase C Delta
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PPAR $\alpha$	Peroxisomaler proliferations-aktivierter Rezeptor Alpha
RIA	<i>Radio-Immuno-Assay</i>

RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Ryr2	Ryanodin-Rezeptor 2
SH2	Src Homologie 2
STH	Somatotropes Hormon
SUR1	Sulfonylharnstoff-Rezeptor 1
T1DM	Typ 1 Diabetes mellitus
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
tBid	<i>truncated Bid</i>
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRAIL	<i>TNF-related</i> Apoptose-induzierender Ligand
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
VDCC	Spannungsabhängiger L-Typ Calciumionen-Kanal
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
WHO	Welt-Gesundheits-Organisation
WTbl6	Wildtyp <i>black 6</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Diabetes mellitus

### 1.1.1 Geschichte des Diabetes mellitus

Diabetes (griechisch "Durchfluss") mellitus (lateinisch "honigsüß"), im Volksmund auch Zuckerkrankheit genannt, fasst eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen zusammen und beschreibt deren ursprüngliches gemeinsames Hauptsymptom: Die Ausscheidung von Glucose im Urin. Dieses Merkmal wurde schon im 15. Jahrhundert vor Christus von Ärzten in Ägypten und Griechenland beschrieben [1].

Während die Diagnose Diabetes mellitus bis 1922 noch als Todesurteil galt, war es nachfolgend möglich den "insulinpflichtigen Diabetes mellitus" (IDDM) auf Grundlage der Entdeckung und Isolation von Insulin durch Nicolae Paulescu zu therapieren [2; 3].

Weiterhin entdeckte J. Fuchs 1955 die blutzuckersenkende Wirkung bestimmter Sulfonamidverbindungen, die noch heute in verbesserter Form zur Therapie des "nicht-insulinpflichtigen Typ 2 Diabetes mellitus" (NIDDM; T2DM) zum Einsatz kommen [4].

### 1.1.2 Klassifikation des Diabetes mellitus

Die aktuelle Einteilung des Diabetes mellitus erfolgt anhand der Empfehlungen der amerikanischen Diabetes-Gesellschaft von 1997 nach ätiologischen Gesichtspunkten [5]. Diese wurde im Jahr 1998 erstmals von der WHO veröffentlicht [6; 7].

Dabei werden vier große Gruppen unterschieden:

**Typ-1-Diabetes mellitus (T1DM):** Hierbei handelt es sich um eine autoimmun vermittelte Erkrankung (Typ 1a), bei der es zur Zerstörung der Betazellen des Pankreas und damit zu einem absoluten Insulinmangel kommt. Es können Antikörper gegen Insulin, Proinsulin, Inselzellen, Glutamat-Decarboxylase (GAD) und Phosphatase (IA2-A) nachgewiesen werden. Hiervon zu unterscheiden ist der Betazellverlust ohne nachweisbare autoimmune Aktivität (idiopathischer Typ 1b). Die Erstmanifestation findet meist in der Kindheit oder Jugend, aber auch im Erwachsenenalter (LADA) statt. Symptome treten erst auf, wenn mehr als 80 % der Betazellmasse verloren gegangen ist.

Die Therapie besteht aus der Substitution von Insulin [8].

**Typ-2-Diabetes mellitus (T2DM):** Dabei handelt es sich mit einem Anteil von ca. 90 % um die häufigste Diabetes-Form [6]. Die Manifestation erfolgt meist erst im späteren Erwachsenenalter, aufgrund veränderter Lebensgewohnheiten aber zunehmend auch schon in jungen Jahren. Ab dem 40. Lebensjahr steigt die Häufigkeit in jedem Lebensjahrzehnt um etwa das Doppelte an und erreicht zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr schließlich eine Prävalenz von 20 % [9]. Adipositas stellt den Hauptrisikofaktor dar und ist bei über 90 % der Patienten zu finden. Übergewicht ist dabei häufig assoziiert mit Insulinresistenz, Hyperinsulinismus, Hypertonie, erniedrigtem HDL-, erhöhtem LDL- sowie Triglyzerid-Spiegel und wird im Gesamten als "*Metabolisches Syndrom*" bezeichnet [10; 11].

**Andere spezifische Typen:** In den letzten Jahren konnten einige Gene identifiziert werden, die das Risiko an Diabetes mellitus zu erkranken mit steigender Anzahl an mutierten Genen und zunehmendem Alter des Patienten erhöhen [12]:

→ Genetische Defekte der Betazelle:

MODY Typ 1 - Mutation des Transkriptionsfaktors HNF-4-alpha

MODY Typ 2 - Mutation der Glucokinase

MODY Typ 3 - Mutation des Transkriptionsfaktors HNF-1-alpha

MODY Typ 4 und MODY Typ 5 - Mutation in IPF-1

→ Genetische Defekte der Insulinsekretion

→ Erkrankungen des exokrinen Pankreas (zum Beispiel Pankreatitis)

→ Endokrinopathien (zum Beispiel Cushing-Syndrom)

→ Medikamente und Chemikalien (zum Beispiel Glukokortikoide)

→ Infektionen (zum Beispiel kongenitale Röteln)

→ ungewöhnliche Formen des immunvermittelten Diabetes (zum Beispiel Stiff-man-Syndrom)

→ andere genetische Syndrome, die mit Diabetes assoziiert sind (zum Beispiel Down-Syndrom)

→ Der Gestationsdiabetes tritt erstmals während der Schwangerschaft auf und bildet sich danach in der Regel wieder zurück.

### **1.1.3 Epidemiologie des Diabetes mellitus**

Insgesamt kann eine globale Zunahme der Prävalenz beobachtet werden. Während im Jahre 2000 die Anzahl der Diabetiker weltweit ca. 150 Millionen Menschen betrug, wird die Zahl nach Meinungen von Experten bis zum Jahre 2025 auf 300 Millionen ansteigen [13].

### **1.1.4 Ätiologie und Folgen des Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus stellt eine Stoffwechselerkrankung unterschiedlicher Ätiologie dar. Aufgrund eines absoluten (T1DM) bzw. relativen Insulinmangels (T2DM) kommt es zur Manifestation einer Hyperglykämie im Blut, zu Veränderungen im Stoffwechsel sowie schließlich zu den charakteristischen Symptomen Polyurie, Polydypsie und Glucosurie.

Spätkomplikationen betreffen insbesondere die großen und kleinen Gefäße und manifestieren sich häufig in Form von Retino-, Nephro- und Neuropathien. Außerdem haben Diabetes-Patienten ein erhöhtes Risiko für Atherosklerose und somit eine verstärkte Gefahr einen Herzinfarkt, einen Schlaganfall oder eine pAVK der Extremitäten zu erleiden. Diese Komplikationen und deren assoziierte Komorbiditäten sind als ursächlich für eine verminderte Lebensqualität sowie für eine erhöhte Mortalität anzusehen. Dabei haben Diabetiker im Durchschnitt eine um 6 bis 7 Jahre verminderte Lebenserwartung, wobei eine Abhängigkeit vom Alter zu beobachten ist. Es gilt: Je früher sich der Diabetes manifestiert, umso geringer ist die Lebenserwartung [14].

## **1.2 Insulin**

### **1.2.1 Geschichte von Insulin**

Insulin wurde 1916 erstmals durch Nicolae Paulescu aus Pankreasgewebe isoliert. Dieser bezeichnete das gewonnene Isolat zunächst als *Pankrein* und zeigte dessen Wirksamkeit auf die Senkung des Blutglucosespiegels sowie die Verringerung des Glucoseverlustes über den Urin bei diabetischen Hunden [2]. 1921 gelang es dem

Wissenschaftler Frederick Grant Banting und seinem Studenten Charles Herbert Best Insulin, welches sie *Isletin* nannten, aus dem Hundepankreas zu extrahieren und damit den Blutzucker von pankreotomierten Hunden zu senken. Schließlich erfolgte am 11. Januar 1922 die erste erfolgreiche Behandlung diabetischer Symptome am Menschen mittels eines Insulin-Extraktes aus dem Rinderpankreas [3].

### **1.2.2 Struktur von Insulin**

Insulin ist ein Polypeptidhormon, welches zunächst als inaktives Präproinsulin (110 Aminosäuren; 11,5 kDa) von den Betazellen der Langerhans-Inseln freigesetzt wird. Diese Vorstufe besteht aus einer A-Kette mit 21 Aminosäuren, einer B-Kette mit 30 Aminosäuren, einem C-Peptid und einer hydrophoben Signalsequenz mit 24 Aminosäuren. Durch die Ausbildung von zwei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen der A- und B-Kette, sowie der proteolytischen Abspaltung der Signalsequenz im endoplasmatischen Retikulum, entsteht das Proinsulin (9 kDa). Durch die enzymatische Abspaltung des C-Peptids in den sezernierenden Granula entsteht schließlich das metabolisch wirksame Insulin mit 51 Aminosäuren (5 kDa). Dieses besteht folglich aus der A- und B-Kette, die durch zwei intermolekulare Disulfidbrücken (zwischen A7 und B7 sowie zwischen A20 und B19) miteinander verbunden sind. Außerdem befindet sich in der A-Kette noch eine intramolekulare Disulfidbrücke (zwischen A6 und A11). Eine weitere Stabilisierung der Tertiärstruktur wird durch Salzbrücken und Van der Waal's Kräfte erreicht. Jeweils sechs Moleküle des blutzuckersenkenden Hormons werden in Form von Hexamer-Kristallen mit je zwei zentralen Zink-Ionen in Vesikeln gespeichert. Bei Bedarf werden diese ins Blut sezerniert. Insulin ist allerdings nur als Monomer aktiv [15].

### **1.2.3 Metabolische Wirkung von Insulin**

Insulin ist das einzige natürlich im menschlichen Körper vorkommende anabole Hormon. Es wird bei einer erhöhten Glucosekonzentration ins Blut sezerniert und induziert die Aufnahme von Glucose, Aminosäuren und Fettsäuren in die Leber, die Muskulatur und das Fettgewebe. Während Insulin die Synthese von Glycogen,

Proteinen und Triglyceriden steigert, hemmt es die Glycogenolyse, die Gluconeogenese, die Proteolyse und die Lipolyse. Außerdem stimuliert es das Wachstum, die Proliferation und die Differenzierung von Zellen [16].

Bei gesunden Menschen liegt der Glucosespiegel im Blutplasma unabhängig von Fasten- und Essensperioden konstant im Bereich von ca. 5 mmol/l (90 mg/dl). Dies ist aufgrund eines präzisen Wechselspiels zwischen Insulinsekretion und Insulinabbau sowie zwischen Glucoseaufnahme in periphere Gewebe und Glucoseproduktion durch die Leber möglich. Die Halbwertszeit von Insulin ist sehr kurz und liegt im Bereich zwischen vier bis sechs Minuten. Dabei können alle insulinsensiblen Organe und Gewebe das Hormon durch Endozytose des Insulin-Rezeptor-Komplexes und die IDE abbauen. Der Hauptanteil der Elimination erfolgt jedoch in der Niere und der Leber [17].

#### **1.2.4 Signalweg von Insulin**

Insulin wirkt an den Zielorganen über Bindung an einen spezifischen membranständigen Rezeptor. Dieser ist eine Tyrosinkinase und besteht aus zwei extrazellulären, regulatorischen alpha- und zwei intrazellulären, katalytischen beta-Untereinheiten. Die Bindung von Insulin an die alpha-Domäne führt zur Aktivierung der beta-Domäne, zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten und zur Konformationsänderung des Rezeptors. Schließlich werden durch den aktivierten Insulinrezeptor die Tyrosinreste weiterer Substrate phosphoryliert. Dabei konnten bisher neun Mediatoren des Rezeptors nachgewiesen werden, von denen vier der Familie der Insulinrezeptor-Substrate (IRS1, IRS2, IRS3, IRS4) angehören. Diese haben trotz einer großen strukturellen Ähnlichkeit sehr unterschiedliche Funktionen in der Signalweiterleitung von Insulin:

Ein Verlust von IRS1 führt bei Mäusen zur Insulinresistenz, einer erniedrigten Glucosetoleranz, aber nicht zur Entstehung eines Diabetes mellitus [18].

Ein Fehlen von IRS2 bewirkt in Mäusen ebenfalls eine verminderte Glucosetoleranz und zusätzlich eine vermehrte Apoptose von Betazellen, sowie die Entwicklung eines Diabetes mellitus [19; 20].

Im Gegensatz dazu hat der Verlust von IRS3 und IRS4 keinen direkten Einfluss auf den

Insulinspiegel und den Blutzucker [21]. Stattdessen reduzieren diese Substrate die Aktivität von IRS1 und IRS2 [22; 23].

An die phosphorylierten Tyrosine der IRS können Proteine binden, die SH2-Sequenzen enthalten. Dazu gehören vor allem PI3K und Grb2, die auf diesem Wege zur Aktivierung von IRS1 und IRS2 führen [16]. Dabei können folglich vor allem zwei Signalwege des Rezeptors unterschieden werden: Der durch PI3K-vermittelte und der MAPK-Signalweg durch Grb2. Beide sind für den Stoffwechsel, das Überleben, die Proliferation sowie die Differenzierung von Betazellen des Pankreas von großer Bedeutung [24; 25].

## **1.3 Das endokrine Pankreas**

### **1.3.1 Langerhans'sche Inselzellen**

Die Langerhans'schen Inselzellen wurden 1869 durch den deutschen Pathologen Paul Langerhans (1847 bis 1888) entdeckt und 5 Jahre später nach ihm benannt. Sie bilden den endokrinen Anteil des Pankreas und nehmen mit einer Anzahl zwischen einer und zwei Millionen 1 bis 2 % der gesamten Bauchspeicheldrüse ein. Ihre Größe schwankt zwischen 100 bis 400 µm, sie sind von einer dünnen Bindegewebskapsel umgeben und setzen sich aus fünf verschiedenen hormonproduzierenden Zellen, sowie Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Nerven zusammen:

Die Betazellen stellen mit einem Anteil von über 80 % den häufigsten Zelltyp der Langerhans'schen Inselzellen dar und werden von den anderen vier Zellarten kreisförmig umgeben. Sie sezernieren Insulin und Amylin (IAPP), welches die Sekretion von Glucagon hemmt, die Entleerung des Magens verlangsamt und Sättigungssignale ans Gehirn sendet.

Die Alphazellen produzieren Glucagon, welches vor allem an der Leber wirkt. Dort stimuliert es die Gluconeogenese sowie die Glykogenolyse und hält so den Blutzucker auch zwischen den Mahlzeiten konstant.

Die Deltazellen setzen Somatostatin frei, welches sich aus zwei Polypeptidketten zusammensetzt. Dieses hemmt die Ausschüttung des Wachstumshormons STH aus dem Hypophysenvorderlappen, sowie von TSH, ACTH, Insulin, Glucagon, Gastrin und

Cholecystokinin.

PP- und D1-Zellen produzieren ein pankreatisches Polypeptid [26].

Die endokrinen Zellen des Pankreas sind durch Gap Junctions untereinander verbunden, wobei Betazellen beispielsweise über Connexin 36 direkt miteinander kommunizieren können. Dies ist für eine effektive Insulinsekretion von großer Bedeutung [27; 28].

Weiterhin sind die Langerhans'schen Inselzellen mit 10 bis 15 % der gesamten Pankreasperfusion sehr gut durchblutet. Die endokrinen Zellen stehen dabei in einem engen Kontakt zu den Endothelzellen, so dass sich die sezernierten Hormone über das Blut schnell im Organismus verteilen können. Der venöse Abfluss erfolgt bei kleineren Inselzellen in das venöse Portalsystem der Insel, während das Blut größerer Langerhansscher Inselzellen direkt in die Portalvene der Leber abgeleitet wird [29].

Die neuronale Kontrolle der Funktion des endokrinen Pankreas erfolgt durch den Sympathikus, den Parasympathikus und die sensorischen Nerven [30].

### **1.3.2 Regulation der Betazellmasse**

Die Betazellmasse setzt sich aus Anzahl sowie Größe der Betazellen zusammen und wird über das Gleichgewicht zwischen Replikation und Neogenese auf der einen Seite sowie Apoptose auf der anderen Seite bestimmt. Des Weiteren bestimmt diese letztendlich die gesamte Insulinmenge, die dem Organismus zur Verfügung steht. Insulinmenge und Stärke des Stimulus beeinflussen dabei gemeinsam die Sekretionskapazität des Pankreas. Pathologische Veränderungen der Betazellmasse können zu verschiedenen Komplikationen des Stoffwechsels führen [31].

Die Betazellen unterliegen einer ständigen altersabhängigen Replikation, Neogenese und Apoptose. Während in der Neugeborenenperiode Replikation und Neogenese überwiegen, nehmen diese Fähigkeiten mit zunehmendem Alter stark ab und die Apoptoserate steigt an. Dadurch verringert sich im höheren Alter neben der Betazellmasse auch das Ausmaß diese dem metabolischen Bedarf anzupassen. Somit erhöht sich das Risiko an Diabetes mellitus zu erkranken [24].

Die Hormone Insulin, IGF-1, GH und GLP-1, sowie Glucose und Fettsäuren beeinflussen den Erhalt der Betazellmasse [32]. Eine vermehrte Apoptose lässt sich durch chronische Hyperglykämie und Hyperlipidämie sowie durch Cytokine und

Glucocorticoide auslösen.

Die Betazellmasse kann sich an einen veränderten Insulinbedarf anpassen. Beispielsweise stimulieren die während der Schwangerschaft vermehrt sezernierten Hormone Prolaktin und Laktogen die Proliferation der Betazellen und deren Masse steigt an [33]. Auch bei Adipösen nimmt diese zunächst durch eine gesteigerte Proliferations- und eine verminderte Apoptoserate zu. Können die Betazellen den gesteigerten Insulinbedarf jedoch nicht mehr ausgleichen, kommt es häufig zur Entstehung von Hyperglykämien sowie zur Entwicklung eines Diabetes mellitus [34]. Eine Abnahme der Betazellmasse wird beim Diabetes mellitus Typ 2 durch Amyloidablagerungen weiterhin begünstigt [35].

## **1.4 Regulation der Insulinsekretion**

Die Regulation der Insulinsekretion aus den Betazellen des Pankreas ist ein komplexes Geschehen und wird durch Glucose, Fettsäuren, Aminosäuren, GLP-1, GIP, Somatostatin und Neurotransmitter beeinflusst. Dabei stellt Glucose den wichtigsten Stimulator dar [36].

### **1.4.1 Glucose-abhängige Regulation der Insulinsekretion**

Bei Zunahme des Blutglucosespiegels erfolgt die Freisetzung von Insulin aus Vesikeln der Betazellen des Pankreas. Dazu sind eine Reihe von aufeinanderfolgenden Einzelschritten notwendig. Zunächst wird Glucose insulinunabhängig über GLUT-2 in die Betazelle aufgenommen [37]. Da GLUT-2 nur eine geringe Affinität für Glucose besitzt, ist dessen Transportleistung während Fastenperioden niedrig, wohingegen sie postprandial mit zunehmendem Glucosespiegel entsprechend ansteigt [38]. Anschließend erfolgt in der Betazelle der Abbau von Glucose über die Glykolyse, den Zitronensäurezyklus und die Atmungskette, wobei ADP zu ATP phosphoryliert wird. Das erste Enzym in diesem Stoffwechselweg, welches Glucose zu Glucose-6-Phosphat abbaut, ist die Glucokinase. Diese besitzt ebenfalls nur eine niedrige Affinität für Glucose und stellt somit neben GLUT-2 einen zweiten empfindlichen Glucosesensor der Betazelle dar [39-41]. Das glykolytische Endprodukt Pyruvat wird in den

Mitochondrien durch die Pyruvatdehydrogenase zu Acetyl-CoA umgewandelt, woraus im Rahmen des Krebs-Zyklus NADH und FADH<sub>2</sub> gebildet werden [42].

Erst bei einer Glucosekonzentration über 5 mmol/l (90 mg/dl) im Plasma steigt in Folge des Glucosemetabolismus der intrazelluläre ATP-Gehalt so weit an, dass die ATP-sensitiven Kaliumionen-Kanäle in der Zellmembran geschlossen werden, die Zelle durch eine zunehmende Konzentration an Kaliumionen von -60 mV auf -40 mV depolarisiert und sich in Folge dessen die spannungsabhängigen L-Typ Calciumionen-Kanäle (VDCC) öffnen [41]. Calciumionen strömen in die Zelle ein, wodurch die insulinhaltigen Granula zur Zellmembran wandern, mit dieser verschmelzen und ihren Inhalt nach außen abgeben [43]. Dabei können zwei verschiedene Arten von sekretorischen Granula sowie zwei Phasen der glucoseinduzierten Insulinsekretion unterschieden werden: Einen kleineren Anteil von weniger als fünf Prozent bilden die *sofort verfügbaren Vesikel*, welche sich bereits in der Nähe der Zellmembran befinden und deren Inhalt direkt sezerniert werden kann. Diese sind für die erste Phase der Insulinsekretion verantwortlich, welche schnell innerhalb von wenigen Minuten nach Anstieg des Blutzuckers eintritt. Den weitaus größeren Anteil von mehr als 95 % bilden die sogenannten *Reserve-Granula*, die erst noch eine Reihe von Reaktionen durchlaufen und zur Zellmembran wandern müssen bevor deren Inhalt freigesetzt werden kann. Dies stellt die zweite Phase der Insulinsekretion dar, welche später eintritt, langsam zunimmt und länger anhält [44].

Parallel zu den beiden Phasen der Insulinsekretion können biphasische Schwankungen des Membranpotentials sowie, abhängig von der Glucosekonzentration, Schwankungen oder nach Anstieg das Einstellen eines Plateaus der Calciumionen-Konzentration beobachtet werden [45].

Die Wirkung der bereits ins Zytoplasma eingeströmten Calciumionen auf die Freisetzung der Vesikel kann durch weitere Produkte aus dem Glucosestoffwechsel verstärkt werden. Dazu gehören vor allem GTP, Malonyl-CoA, Glutamat und der Pyruvat-Malat-Austauscher in der Membran der Mitochondrien. Pro Molekül Glucose entstehen im Rahmen des Zitronensäurezyklus jeweils zwei Moleküle GTP. Diese beeinflussen über die Bindung sogenannter kleiner G-Proteine einerseits das Gleichgewicht von Calciumionen in den Mitochondrien und andererseits den Transport insulinhaltiger Granula sowie deren Fusion mit der Zellmembran. Auf diese Weise kann

GTP die Insulinsekretion unabhängig von der zytoplasmatischen Calciumionen-Konzentration induzieren [46-48]. Durch den Zitronensäurezyklus kommt es außerdem zur Bildung von Zitrat. Bei einem erhöhten Blutzuckerspiegel wird dessen Überschuss wieder zurück ins Zytoplasma transportiert und in Malonyl-CoA umgewandelt, welches wiederum den Fettsäurerezeptor Carnitin-Palmitol-Transferase 1 in der Mitochondrienmembran hemmt. Dadurch können Fettsäuren nicht in die Mitochondrien transportiert und im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation verstoffwechselt werden, sondern sammeln sich im Zytoplasma als langkettiges Azy-CoA, welches die Ausschüttung insulinhaltiger Granula zusätzlich stimulieren kann, an [49]. Weiterhin erfolgt der Abbau von alpha-Ketoglutarat aus dem Zitratzyklus zu Glutamat, von welchem der Überschuss ebenfalls ins Zytosol transportiert und von den insulinhaltigen Vesikeln aufgenommen wird. Auf diese Weise kann es die Wirkung der eingeströmten Calciumionen auf die Vesikelsekretion steigern [50-52]. Außerdem wird Pyruvat in die Mitochondrien transportiert, im Rahmen des Zitratzyklus zu Oxalacetat carboxyliert, in Malat umgewandelt, wieder ins Zytosol zurück transportiert und dort zu Pyruvat, welches wieder den Mitochondrien zugeführt werden kann, decarboxyliert. Durch diesen Austausch von Pyruvat und Malat erhöht sich die NADPH-Konzentration im Zytoplasma, wodurch wiederum das Redoxpotential der Betazelle verändert wird [53].

Des Weiteren wird durch den Metabolismus von Glucose die PLC mit der Bildung von IP3 und DAG aktiviert. Während IP3 den Ausstrom von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum stimuliert, führt DAG zur Aktivierung der PKC [54-56].

Außerdem bewirkt Glucose durch Aktivierung der PLA<sub>2</sub> die gesteigerte Bildung von Arachidonsäure [57; 58]. Dabei ist die PLA<sub>2</sub> nicht für die Stimulation der Insulinsekretion, sondern für die Aufrechterhaltung der Insulinspeicher in den Betazellen verantwortlich [59]. Aus Arachidonsäure bilden die beiden Enzyme Cyclooxygenase und Lipxygenase unter anderem die Metabolite Prostaglandin und Leukotrien, welche die Insulinsekretion positiv und negativ beeinflussen können [58].

Außerdem wird durch Arachidonsäure der Einstrom von Calciumionen über die Zellmembran sowie der Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum erleichtert [60].

### **1.4.2 FFA-abhängige Regulation der Insulinsekretion**

Freie Fettsäuren steigern die GSIS entweder direkt durch Bindung an den GPR40/FFAR1-Rezeptor oder indirekt durch den Abbau von im Zytoplasma akkumuliertem, langkettigem Azyl-CoA [61]. Die Aktivierung von GPR40/FFAR1 bewirkt einerseits durch die Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ Calciumionen-Kanälen und andererseits durch die Aktivierung von Phospholipase C, welche IP3 und DAG bildet, einen Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration [62]. IP3 stimuliert dabei die Mobilisation von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol und DAG aktiviert die PKC, was wiederum selbst die Insulinsekretion beeinflusst [63; 64]. Ein Anstieg der Calciumionen-Konzentration im Zytosol bedingt außerdem die Aktivierung verschiedener Dehydrogenasen, wie die Pyruvat-, Isocitrat- und Alpha-Ketoglutarat-Dehydrogenase, die für den Abbau von Pyruvat im Rahmen des Zitratzyklus verantwortlich sind [65]. Im Zytosol abgelagertes langkettiges Azyl-CoA steigert die GSIS entweder direkt oder über Aktivierung von PKC [66; 67].

### **1.4.3 Inkretin-abhängige Regulation der Insulinsekretion**

Inkretine sind Peptidhormone mit insulinotroper Wirkung, die nach oraler Nahrungsaufnahme von den endokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes freigesetzt werden und durch Bindung an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die GSIS erhöhen können. Auf diese Weise steigt der Insulinspiegel im Blut nach oraler Aufnahme von Glucose stärker an, als nach intravenöser Verabreichung [68]. Die bedeutendsten Inkretine stellen GIP und GLP-1 dar.

GIP wurde bereits in den 70iger Jahren entdeckt und ist für etwa die Hälfte der Effekte der Inkretine verantwortlich [69]. Es besteht aus 42 Aminosäuren, dessen Freisetzung erfolgt vor allem nach Aufnahme schnell verdaulicher, kleiner Nahrungsmengen und es wird innerhalb von 2 Minuten durch DPP-IV wieder inaktiviert [70; 71]. Nach Bindung an dessen spezifischen Rezeptor, welcher vor allem in den Langerhans'schen Inselzellen des Pankreas, im Darm, im Fettgewebe, in der Hypophyse, in der Nebennierenrinde und in verschiedenen Bereichen des Gehirns exprimiert wird,

stimuliert es die Adenylatzyklase und führt wahrscheinlich über die Bildung von cAMP zur Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ Calciumionen-Kanälen. Außerdem erfolgt durch cAMP die Aktivierung von PKA, CREB sowie Epac2 [72-75].

Als zweite Substanz mit Inkretinwirkung wurde GLP-1 bekannt [76]. Es besteht aus 30 Aminosäuren, dessen Sekretion erfolgt besonders nach Aufnahme komplexer Nahrungsbestandteile und es wird innerhalb von 90 Sekunden durch DPP-IV wieder inaktiviert [70; 71]. Der zugehörige G-Protein-gekoppelte Rezeptor (GLP-1R) ist vor allem im Gastrointestinaltrakt, in den Alpha- und Betazellen des Pankreas, in der Lunge, in der Niere, im Herz und in verschiedenen Bereichen des Gehirns zu finden. Auch hier kommt es durch die Aktivierung der Adenylatzyklase mit Bildung von cAMP zur Stimulation von PKA, CREB und Epac2 [72-75].

Die Proteinkinase A bewirkt zunächst das Schließen der ATP-abhängigen Kaliumionen-Kanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) durch Phosphorylierung der SUR1-Untereinheit. Dadurch depolarisiert die Zellmembran, Calciumionen strömen durch die sich öffnenden VDCC und aus intrazellulären Depots ins Zytoplasma ein und die Freisetzung der insulinhaltigen Vesikel wird induziert [77-79]. Außerdem hemmt die PKA spannungsabhängige Kaliumionen-Kanäle ( $K_V$ -Kanäle) und verlängert so die Phase der Depolarisation [80].

Über CREB induziert GLP-1 die Transkription von insulincodierenden Genen [81]. Wahrscheinlich indirekt über Insulin erfolgt dazu zunächst die Aktivierung von IRS2, welches anschließend PI3K induziert, welches wiederum FoxO1 durch Phosphorylierung hemmt [82; 83]. Dadurch wird die Translokation von Pdx-1 in den Zellkern induziert, wo dieses die Expression der Insulingene stimuliert [84; 85]. Weiterhin trägt die Aktivierung von EGFR durch den aktivierten GLP-1-Rezeptor mit Induktion von PI3K zur insulinotropen Wirkung von GLP-1 bei [86].

Epac2 interagiert einerseits mit Proteinen wie Rim2, die die Verschmelzung der insulinhaltigen Granula mit der Zellmembran beeinflussen [87]. Andererseits aktiviert es Ryr2 sowie IP3R, wodurch es den Ausstrom von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol und ebenfalls die Exozytose der insulinhaltigen Granula stimuliert [88; 89].

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ist die Wirkung der Inkretine verloren gegangen oder stark beeinträchtigt. Obwohl die Freisetzung von GIP noch normal ist, ist

dessen Wirkung auf die Insulinsekretion stark vermindert. Dahingegen ist zwar die Ausschüttung von GLP-1 vermindert, aber dessen Effekt auf die Insulinfreisetzung dennoch erhalten geblieben. Durch die Zufuhr von GLP-1 kann die Sensibilität der Betazellen gegenüber Glucose sowie die GSIS bei den meisten Patienten wieder gesteigert werden [90-92].

#### **1.4.4 Neuronale Regulation der Insulinsekretion**

Die GSIS wird durch den Parasympathikus stimuliert und durch den Sympathikus sowie die sensorischen Nerven gehemmt [93; 94].

Der Parasympathikus sezerniert nach Aktivierung Acetylcholin und verschiedene Neuropeptide, wie VIP, PACAP und GRP. Acetylcholin bindet an  $G_q$ -Protein-gekoppelte muskarinerge Rezeptoren in der Zellmembran von Betazellen und aktiviert so die PLC zur Bildung von IP<sub>3</sub> und DAG aus PIP<sub>2</sub>, wobei IP<sub>3</sub> die Mobilisation von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum und DAG die Aktivierung der PKC induziert [95-97]. Außerdem wird durch die cholinerge Aktivierung auch die PLA<sub>2</sub> aktiviert, die die Bildung von Arachidonsäure induziert und die Insulinfreisetzung stimuliert [98]. Des Weiteren verstärkt Acetylcholin durch Zunahme der Membranpermeabilität für Natriumionen die Depolarisation der Betazellen sowie die Öffnung der spannungsabhängigen L-Typ Calciumionen-Kanäle [99-102]. VIP und PACAP binden an ihren zugehörigen G-Protein-gekoppelten Rezeptor und aktivieren auf diese Weise die Adenylatzyklase mit der Bildung von cAMP [103]. GRP bindet ebenfalls an seinen spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor und aktiviert so die PLC [104].

Die Aktivierung des Sympathikus führt zur Freisetzung von Noradrenalin und verschiedenen Neuropeptiden, wie Galanin und Neuropeptid Y. Wie auch Adrenalin aus dem Nebennierenmark bindet Noradrenalin an den Alpha-2-Adrenorezeptor, der von den humanen Langerhans'schen Inselzellen des Pankreas in Form von zwei verschiedenen Typen exprimiert wird: Dem 2A- und dem 2C- Subtyp [105]. Durch beide Rezeptortypen kann die GSIS auf wahrscheinlich direktem Weg unterdrückt werden [106; 107]. Dabei wird nach Aktivierung des gekoppelten, Pertussistoxinempfindlichen, inhibitorischen G-Proteins ( $G_i$ -Protein) die Adenylatzyklase und damit

die Bildung von cAMP gehemmt. Außerdem ist in diesem Zusammenhang eine Hyperpolarisation der Membran, eine Abnahme des Einstroms von Calciumionen und eine Aktivierung von GIRK-Kanälen in den Betazellen zu beobachten [108]. Galanin und Neuropeptid Y binden ebenfalls an spezifische Rezeptoren der Betazelle und hemmen so die Freisetzung der insulinhaltigen Granula durch Hyperpolarisation der Membran der Betazellen, Verminderung des Calciumionen-Einstroms und Hemmung der cAMP-Bildung [109]. Außerdem hat Galanin einen direkt hemmenden Einfluss auf die Exozytose der insulinhaltigen Vesikel [110].

Die sensorischen Nerven produzieren und sezernieren das Neuropeptid CGRP mit ebenfalls inhibitorischer Wirkung auf die Insulinsekretion [111].

## **1.5 GPR40/FFAR1**

### **1.5.1 Aufbau und Funktion von GPR40/FFAR1**

GPR40/FFAR1 stellt, wie auch GPR41, GPR43 und GPR120, einen Rezeptor für freie Fettsäuren dar und gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten transmembranen Rezeptoren. Diese weisen eine Sequenzhomologie von 30 bis 40 % auf.

GPR41, welches vor allem im Fettgewebe exprimiert wird und die Produktion von Leptin stimuliert, sowie GPR43 werden durch kurzkettige FFA aktiviert. Die Liganden von GPR40, welcher auch als FFA-Rezeptor 1 (FFAR1) bezeichnet wird, sowie GPR120, welcher vor allem im Darm exprimiert wird und die GLP-1-Sekretion induziert, sind mittel- bis langkettige Fettsäuren [112-121].

GPR40/FFAR1 wird vor allem in den Betazellen des Pankreas, aber auch im Gehirn und in den Monozyten exprimiert [63; 122-125]. Dabei wird die Expression in den Langerhans'schen Inselzellen des Pankreas durch FFA reguliert und ist in diabetischen Inseln geringer als in gesunden Kontrollinseln. Des Weiteren hat dieser eine große Bedeutung bei der über FFAs-vermittelten Steigerung der GSIS, welche selbst positiv mit der Expression des Rezeptors korreliert. Diese Sachverhalte lassen vermuten, dass der GPR40/FFAR1-Rezeptor für die chronisch abnehmende Funktion der Betazellen im Rahmen des Typ 2 Diabetes mellitus eine große Bedeutung hat [63; 126-128].

Bisher sind zwei Polymorphismen im Gen für GPR40/FFAR1 auf Chromosom 19q13.1

bekannt: Eine Austausch von Arginin gegen Histidin an Position 211 und seltener von Asparaginsäure gegen Asparagin an Position 175 [118; 129;130].

Der Rezeptor ist an  $G_{\alpha q/11}$ , eine Untereinheit des G-Proteins gekoppelt, welche nach Aktivierung von GPR40/FFAR1 die PLC aktiviert. Diese hydrolisiert PIP2 in DAG und IP3 und induziert damit die Aktivierung der PKC sowie die Freisetzung von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma [62; 63; 124; 125; 131-134]. Da durch die Aktivierung von GPR40/FFAR1 die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration ansteigt und PKC aktiviert wird, wird eine Funktion des Rezeptors in der Insulinsekretion vermutet [63; 125; 135]. Des Weiteren führt GPR40/FFAR1 über cAMP zu einer Hemmung von Kaliumionen-Kanälen [136].

### 1.5.2 Agonisten und Antagonisten von GPR40/FFAR1

Agonisten für GPR40/FFAR1 sind gesättigte und ungesättigte mittel- (C6 bis C12) bis langkettige (C14 bis C24) Fettsäuren mit einer Größe von 2 bis 17  $\mu\text{m}$  (zum Beispiel Linolsäure), welche die GSIS zumindest zum Teil über GPR40/FFAR1 steigern [63; 125; 135; 137]. Außerdem stellt die synthetisch hergestellte Substanz GW9508 (4-(Benzylamino)Dihydrocinnamic-Säure-Derivat), welche von Garrido et al. entdeckt wurde, sowohl für GPR40/FFAR1 als auch für GPR120 einen wichtigen Liganden dar [138-140]. Daneben wäre noch der selektive Agonist MEDICA16 und TUG-424 (4-Phenethynyldihydrocinnamic-Säure-Derivat) zu nennen [105; 138; 141; 193].

Innerhalb der Bindungstasche von GPR40/FFAR1 sind 12 Reste bekannt: Sowohl Linolsäure, als auch GW9508 binden über ihre Carboxylgruppe an die hydrophilen Reste Arg<sup>183</sup>, Asn<sup>244</sup> und Arg<sup>258</sup>. Weiterhin interagiert vor allem GW9508, aber kaum oder überhaupt nicht Linolsäure mit den Resten His<sup>86</sup>, Tyr<sup>91</sup> und His<sup>137</sup>. Dabei ist die Bindung von GW9508 an His<sup>137</sup> und zum Teil an His<sup>86</sup> abhängig vom pH-Wert. Des Weiteren sind Tyr<sup>12</sup>, Tyr<sup>91</sup>, His<sup>137</sup> und Leu<sup>186</sup> wichtig für die Aktivierung des Rezeptors. Aufgrund der größeren Anzahl an Bindungen von GPR40/FFAR1 mit GW9508 als mit Linolsäure, hat dieser synthetische Agonist eine stärkere Interaktion und Wirkung [139]. Ölsäure ist eine einfach ungesättigte langkettige Fettsäure (C18) mit einer sehr hohen Affinität für GPR40/FFAR1. In Abhängigkeit von dessen Konzentration sowie von der Anwesenheit von Glucose erhöht es die zytoplasmatische Konzentration an

Calciumionen über Aktivierung der PLC und Öffnung der L-Typ Calciumionen-Kanälen. Daraus resultiert wiederum eine Zunahme der GSIS. Durch Inhibitoren der PLC (zum Beispiel Neomycin), Fehlen von Calciumionen im Extrazellularraum, L-Typ Calciumionen-Kanal-Blocker (Nitrendipin) sowie einer Expressionshemmung von GPR40/FFAR1 durch spezifische siRNA bleibt dieser Effekt aus. Dagegen beeinflusst eine Hemmung der Calciumionen-Kanäle des endoplasmatischen Retikulums durch Thapsigargin diese Wirkung nicht [62].

Einen selektiven Antagonisten für GPR40/FFAR1 stellt GW1100 dar. Dieser hemmt einerseits die über GPR40/FFAR1 stimulierte Zunahme der intrazellulären Konzentration von Calciumionen, hat aber andererseits keinen Effekt auf die über GPR120 vermittelte Mobilisierung von Calciumionen. Dabei kann die durch Linolsäure stimulierte Insulinausschüttung durch GW1100 nur zum Teil geschwächt werden [138]. Liganden für GPR120 sind neben mittel- und langkettigen Fettsäuren sowie GW9508 auch die zwei Grifolin-Derivate Grifolsäure und Grifolsäuremethylether, die sowohl als Agonisten wirken und ERK aktivieren können, als auch als Antagonisten die Wirkung von Linolsäure hemmen können [142; 193]. Des Weiteren können diese mit geringerer Stärke auch als Antagonisten von GPR40/FFAR1 wirken [193].

GPR41 und GPR43 werden durch kurzkettige Fettsäuren mit weniger als 6 C-Atomen (zum Beispiel Acetat) aktiviert [63; 125; 143-145].

### **1.5.3 GPR40/FFAR1 als therapeutisches Target bei Typ 2 Diabetes mellitus**

Die Inkretin-ähnliche Wirkung von FFA in Bezug auf die Steigerung der GSIS in Betazellen über GPR40/FFAR1 kann zur Entwicklung neuer Medikamente beim Typ 2 Diabetes mellitus beitragen [146]. Dabei trägt GPR40/FFAR1 zu ca. 50 % an der Fettsäure-vermittelten Zunahme der GSIS in vitro und in vivo bei [131]. Somit stellt GPR40/FFAR1 ein potentiell therapeutisches Ziel in der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 dar.

Der synthetisch hergestellte GPR40/FFAR1-Agonist 3-[4-(4-chlorobenzylamino)phenyl] propanoic acid verbessert sowohl bei oraler, als auch bei intravenöser und intraperitonealer Zuckerezufuhr die Glucosetoleranz durch Steigerung der GSIS. Dieser Effekt kann nach akuter Aktivierung des Rezeptors sogar in

übergewichtigen und insulinresistenten Ratten beobachtet werden [147].

## **1.6 Wirkung der FFAs**

### **1.6.1 Metabolismus von FFAs in den Betazellen**

Für die Stimulation der Insulinsekretion durch FFAs müssen diese zunächst zu langkettigem Azyl-CoA durch die Azyl-CoA-Synthetase im Zytosol umgewandelt, in die Mitochondrien der Betazellen transportiert und oxidiert werden [148; 149]. Dabei existieren ATP-abhängige und ATP-unabhängige Signalwege zur Steigerung der GSIS, wobei der genaue Mechanismus noch nicht verstanden ist [150; 151].

Fettsäuren entstehen zum Teil im Rahmen des Metabolismus hoher Konzentrationen von Glucose durch Hemmung der Carnitin-Palmitol-Transferase I und Anhäufung von langkettigem Azyl-CoA im Zytoplasma [49; 152]. Diese stimulieren die Exozytose insulinhaltiger Granula direkt, indem sie die Fusion mit der Plasmamembran der Betazellen sowie die Anzahl der Bindungsstellen für Vesikel aus dem Reservepool erhöhen [66].

Außerdem zeigen mit Glucose inkubierte Inseln eine de novo Synthese von FFA aus Glucose, wobei der Anteil gesättigter gegenüber ungesättigter Fettsäuren leicht überwiegt, sowie eine Freisetzung aus den pankreatischen Betazellen ins umgebende Medium, was wahrscheinlich einen weiteren Mechanismus der Regulation der GSIS darstellt [153].

Des Weiteren wird die Insulinsekretion durch Aktivierung der Lipolyse über die Hormon-sensitive Lipase mit Bildung von FFA und anderen Lipid-Signalmolekülen reguliert [154].

### **1.6.2 Wirkung von FFAs auf den Glucosemetabolismus**

Ein Anstieg der Konzentration von FFA im Blutplasma vermindert die zelluläre Aufnahme von Glucose sowie dessen Metabolismus [155]. Dies geschieht durch die gesteigerte Betaoxidation mit einer vermehrten Bildung von Azetyl-CoA, einer Hemmung der Pyruvatdehydrogenase sowie einer verminderten Oxidation von Pyruvat

[155]. Außerdem bewirken Citrat und ATP eine Hemmung der Phosphofruktokinase der Glykolyse und damit eine Anhäufung von Glucose-6-Phosphat, welche wiederum die Hexokinase und damit den Transport bzw. die Phosphorylierung von Glucose hemmt [155].

### **1.6.3 Wirkung von FFAs auf die Ionenkanäle**

FFAs können die Ionenkanäle der Plasmamembran indirekt über deren Stoffwechselprodukte oder aber auch direkt beeinflussen [156; 157].

So hemmen beispielsweise die Produkte Prostaglandin I<sub>2</sub> und Prostaglandin E<sub>2</sub> der Arachidonsäure Kaliumionen-Kanäle sowie spannungsabhängige Calciumionen-Kanäle [158-160]. Prostaglandin E<sub>2</sub> induziert außerdem die Zunahme der intrazellulären Konzentration an Calciumionen und die Aktivierung von Chloridionen-Kanälen [161]. Weitere Produkte stellen Leukotrien A<sub>4</sub> und Leukotrien C<sub>4</sub> dar, die die Aktivierung von Kaliumionen-Kanälen vermitteln [162].

Direkte Effekte verursachen diese an Kaliumionen- und Calciumionen-Kanälen [163; 164]. Dabei interagieren die Fettsäuren entweder direkt mit dem Ionenkanal oder werden in die Lipidschicht der Membran eingebaut [165].

Des Weiteren ist die Wirkung von mittelkettigen Fettsäuren stärker als von kurz- oder langkettigen FFAs, da diese bezüglich ihrer hydrophoben Eigenschaften eine Mittelstellung einnehmen und somit effizienter mit den Proteinen der Plasmamembran interagieren können [163; 166; 167].

Der Effekt auf die Ionenkanäle kommt schließlich durch die Acylierung von Proteinen zustande [168].

### **1.6.4 Wirkung von FFAs auf die PKC**

Es existieren 12 Isoenzyme der PKC, die in drei Gruppen eingeteilt werden: die klassische PKC (cPKC), die neue PKC (nPKC) und die atypische PKC (aPKC). Während die Enzyme der ersten Gruppe sowohl von DAG als auch von Calciumionen abhängig sind, ist die zweite Gruppe nur auf DAG angewiesen und die dritte Gruppe von beiden unabhängig. Die PKC wird durch FFAs sowie deren Metabolite aktiviert

und beeinflusst die GSIS [169]. Dabei interagiert die PKC $\alpha$  einerseits mit dem exozytotischen Apparat der insulinhaltigen Granula und aktiviert andererseits die Adenylatzyklase mit der Bildung von cAMP, welches diese wiederum negativ reguliert [170-172].

Es ist nicht klar, ob alle Unterformen des Enzyms an der Insulinfreisetzung beteiligt sind [173; 174]. Während langkettiges Azy-CoA die cPKC aktiviert, kann es auf die nPKC und die aPKC hemmend wirken [175].

### **1.6.5 Wirkung von FFAs auf den Signalweg von Insulin**

Erhöhte Konzentrationen von FFAs oder deren Metabolite in den Zellen von Muskel- und Fettgewebe vermindern durch Reduktion der stimulatorischen Wirkung von Insulin die Phosphorylierung von IRS-1 sowie die Aktivität der PI3K und der PKC [176].

Dabei bestimmt die Zusammensetzung der Fettsäuren in den Positionen *sn*-1- und *sn*-2 die Aktivität von Phosphoinositiden und kann durch den Einfluss anderer Fettsäuren so verändert werden, dass die Wirkung von DAG und Ceramiden auf PKB und PKC beeinflusst wird [177-179].

Ceramide können intrazellulär aus Palmitinsäure de novo synthetisiert werden und nach Stimulation durch Insulin die Phosphorylierung von PKB und dadurch die Synthese von Glykogen hemmen [180; 181]. Außerdem steigert die akute Exposition gegenüber Palmitinsäure die Wirkung von Insulin auf die pankreatischen Betazellen in Form einer Steigerung der basalen und Insulin-induzierten Phosphorylierung der Tyrosinreste des Insulinrezeptors, von IRS-1 sowie von PI3K [153].

## **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung einer spezifischen Stimulation des GPR40/FFAR1-Rezeptors auf insulinsezernierende Betazellen des Pankreas zu erforschen.

Dazu wurde zunächst die Expression von GPR40/FFAR1 in Langerhans'schen Inselzellen der Maus sowie in INS-1E- und MIN6-Zellen mittels PCR nachgewiesen.

Anschließend wurde der Einfluss von spezifischen GPR40/FFAR1-Agonisten und

Antagonisten auf die GSIS in Inseln der Maus und INS-1E-Zellen untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Mausmodelle und Zelllinien

Tabelle 1 Verwendete Mausmodelle und Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller
C57BL/6NCrl-Maus	Charles River Laboratorien, Wilmington, MA
GPR40-KO-Maus	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Klaus Seuwen, Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz
INS-1E-Zellen	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. C. B. Wollheim, Universität von Genf, Schweiz

#### 2.1.2 Enzyme und zugehörige Puffer

Tabelle 2 Verwendete Enzyme und zugehörige Puffer

Bezeichnung	Puffer	Firma
Reverse Transkriptase (RT)	5 x RT-Puffer	Roche
TaKaRa La Taq <sup>TM</sup>	10 x Taq-Polymerase-Puffer	Cambrex
Collagenase		Serva, Heidelberg, D

#### 2.1.3 Größenstandards

Tabelle 3 Verwendete DNA-Standards

Bezeichnung	Firma
123 bp DNA-Leiter	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

#### 2.1.4 Kommerziell erworbene Kits

Tabelle 4 Verwendete Kits

Verwendungszweck	Bezeichnung	Firma
DNA-Amplifizierung	dNTP-Mix 10 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
	Oligo(dt) <sub>12-18</sub> -Primer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Insulin-Messung	Ratten-Insulin ELISA	Mercodia
	Ratten-Insulin RIA	Linco, USA
RNA-Isolierung	RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
	RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, D

## 2.1.5 Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

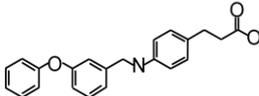
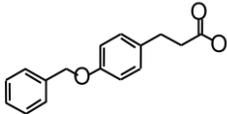
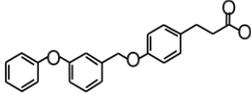
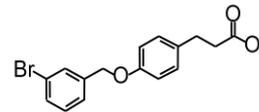
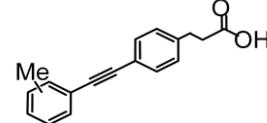
Tabelle 5 Verwendete Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

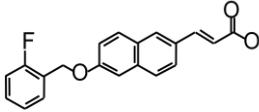
Bezeichnung	Reagenzien	Menge	Endkonzentration
10 x TAE (pH 8,0)	Tris	108 g	0,4 M
	EDTA-Natrium <sub>2</sub> -Salz (pH 8,0)	40 ml	0,01 M
	Essigsäure	55 g	0,2 M
	Aqua dest.	ad 1 l	
10 x Agarose-Blaupuffer	20 % (v/v) Ficoll	40 ml	
	1 x TAE	10 ml	
	0,05 % (w/v) Bromphenolblau	0,05 g	
	Aqua dest.	ad 100 ml	

## 2.1.6 GPR40-Rezeptor-Liganden

Die synthetisch hergestellten Agonisten und Antagonisten von GPR40 wurden freundlicherweise von Trond Ulven (University of Southern Denmark) zu Verfügung gestellt.

Tabelle 6 Verwendete GPR40-Rezeptor-Liganden

Liganden	Bezeichnung	Strukturformel	Summenformel	Molekulargewicht	DMSO-Stammlösung
Agonisten	GW9508		C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	347,41	10 mM
	TUG-20			256	10 mM
	TUG-187			348	10 mM
	TUG-221			335	10 mM
	TUG-424				10 mM

Ligan- den	Bezeichnung	Strukturformel	Summen- formel	Molekular- gewicht	DMSO- Stammlösung
Anta- gonisten	TUG-178			348	5 mM

## 2.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten Chemikalien und Reagenzien verwendet.

**Tabelle 7**      **Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

Bezeichnung	Firma
Adrenalin	
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
BSA V/FFA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, D
D-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, D
di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, D
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethidiumbromid (1 µg/µl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
FCS	Biochrom, Berlin, D
Ficoll	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Hepes (1 M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, D
L-Glutamin (200 mM)	
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhydroxid(NaOH)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ölsäure	
Palmitinsäure	
PBS	Gibco
Pertussistoxin	
RPMI 1640 (11 mM Glucose)	Cambrex
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Trypsin (10fache Stammlösung)	Gibco

## 2.1.8 Geräte und Hilfsmittel

**Tabelle 8**      **Verwendete Geräte und Hilfsmittel**

<b>Verwendungszweck/Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
Agarose-Elektrophorese-Zubehör	Consort E835 Electrophoresis Power Supply Elektrophoresekammer 40-0708 Kämme	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Autoklav		
Binokular		Hongtech
UV-Transilluminator	MidiDoc™	Herolab
Heizblock	Blockthermostat	Kleinfeld Labortechnik
Inkubations-schränke	Heracell	Heraeus
Magnetrührer		
Mikroskop	Axiovert25	Zeiss
Mikrowelle		
Neubauer-Zählkammer	Neubauer	Assistent
pH-Meter	pH526	MultiCal (WTW)
Pipetten	Accu-Jet Pipettierhilfe Pipetten (20/200/1000 µl) 8-Kanal-Pipette (5-100 µl)	Abimed Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Schüttelplatte	KS 501	IKA Labortechnik
Spektralphotometer		Eppendorf
Thermocycler	Techne	Progene
UV-Kamera	MidiDoc™	Herolab
Vortexer	Drehzahl Elektronik	Ikamag
Waage	PG202 AB104	Mettler-Toledo Mettler-Toledo
Wasserbad		Julabo
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus

## 2.1.9 Verbrauchsmittel

**Tabelle 9**      **Verwendete Verbrauchsmittel**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
24-Well-Platten	Techno Plastic Product AG, Schweiz
Beckman 96-Well Platte	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
Einweg-Impfösen (1 µl)	VWR International, Wien (AU)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Falcons (15 und 50 ml)	Greiner bio-one
Gewebekulturflaschen	Biochrom
Küvetten	Sarstedt Nürnberg
Microwell 96F Platte	Nunc GmbH & Co KG, Rosteilde, Dänemark
Parafilm	American National Can, Chicago, USA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
PCR Softstrips	Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf, D
Petrischalen	
Petri-Tissue 1008	
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, D
Sterilfilter Millex-GS	Millipore
Zellkulturschalen (75 cm <sup>2</sup> )	Techno Plastic Product AG, Schweiz

## **2.2 INS-1E-Zellen**

INS-1E-Zellen gehören einer pankreatischen, tumoralen Zelllinie der Ratte an und wurden freundlicherweise von Prof. Dr. C. B. Wollheim der Universität Genf (Schweiz) zur Verfügung gestellt.

### **2.2.1 Kultivierung der INS-1E-Zellen**

Die Aufbewahrung der Zellen über einen längeren Zeitraum erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die zugehörigen Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und unter der Sterilbank kurz geöffnet, damit das enthaltene Stickstoffgas entweichen konnte. Anschließend wurden die INS-1E-Zellen bei 37 °C aufgetaut, der Überstand verworfen und zu dem Sediment am Boden des Röhrchens frisches Medium gegeben. Nun wurden die Zellen vorsichtig mit einer Pipette aus dem Röhrchen in eine Kulturflasche transferiert, in der am nächsten Tag nach Anheften der Zellen das Medium gewechselt wurde.

Bei der Trypsinisierung wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 15 ml auf 37 °C erwärmtem, sterilem PBS (ohne Calciumionen und Magnesiumionen, pH 7,2) gewaschen um das restliche Medium vollständig zu entfernen. Anschließend wurde das PBS wieder abgesaugt und die Zellen durch 10 ml einer 37 °C warmen Trypsin-PBS-Lösung (1:4) sowie einer fünfminütigen Inkubation bei 37 °C vom Boden der Flasche abgelöst. Durch Zugabe von 25 ml kaltem Kulturmedium wurde die Verdauungsreaktion gestoppt. Um die Zellen zu vereinzeln wurden sie nun mehrmals vorsichtig aspiriert. Danach wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (300 rpm für 4 Minuten bei Raumtemperatur), der Überstand verworfen, das Sediment in 10 ml neuem Medium resuspendiert und die Anzahl der Zellen mittels der Neubauer-Zellkammer ermittelt. Dabei entsprechen 100 Zellen auf 16 Quadraten einer Zellzahl

von  $10^6$  pro ml Suspension. Die Zellen wurden nun in  $75 \text{ cm}^2$  großen Zellkulturflaschen in einer Dichte von  $4\text{-}5 \times 10^6$  Zellen/20 ml RPMI-Medium, welches alle zwei Tage gewechselt wurde, ausgesät und für eine Woche bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  im Inkubator kultiviert. Dabei erreichten diese eine Konfluenz von  $80\%$ . Zwei bzw. drei Tage vor dem Experiment wurde die INS-1E-Zellen in einer Dichte von  $1,5$  bzw.  $0,75 \times 10^5$  Zellen/Well auf jeweils zwei 24-Well-Platten ausgesät und für diesen Zeitraum bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert.

**Tabelle 10**      **Ansatz zur Herstellung des Kulturmediums für die INS-1E-Zellen**

Reagenzien	Menge	Endkonzentration
FCS (v/v)	5 ml	10 %
L-Glutamin (200 mM)	0,5 ml	2 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol (5 mM)	0,5 ml	50 $\mu\text{M}$
Hepes (1 M)	0,5 ml	10 mM
Natriumpyruvat (100 mM)	0,5 ml	1 mM
Penicillin/Streptomycin	0,5 ml	100 i.u. bzw. 100 $\mu\text{g/ml}$
RPMI 1640 (11 mM Glucose)	ad 50 ml	

## 2.3 Langerhans'schen Inselzellen der Maus

Zur Isolation von Inseln des Pankreas wurden C47BL/6NCrI-Mäuse (Charles River Laboratorien, Wilmington, MA) sowie GPR40-KO-Mäuse (Klaus Seuwen, Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz) verwendet, die männlich und zwischen 4 bis 6 Monate alt waren.

### 2.3.1 Herstellung der vierfach konzentrierten Hanks-Lösung

**Tabelle 11**      **Ansatz zur Herstellung von vierfach konzentrierter Hanks-Lösung**

Reagenzien	Menge	Endkonzentration
NaCl	32 g	137 mM
KCl	1,6 g	5,4 mM
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (extra lösen)	0,74 g	1,26 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,8 g	0,8 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,24 g	0,4 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,24 g	0,44 mM
$\text{NaHCO}_3$	1,4 g	4,2 mM
Hepes (1 M)	9,5 g	10 mM
Destilliertes Wasser	ad 1 l	

Die Reagenzien wurden alle bis auf Calciumchlorid zusammen eingewogen. Dieses wurde getrennt in 10 ml destilliertem Wasser gelöst, damit es nicht ausfällt und anschließend der Lösung zugefügt. Aus dieser vierfachen Hanks-Lösung wurden am Tag des Experiments die Präparierlösungen hergestellt. Dabei werden drei verschiedenen Lösungen unterschieden.

**Präparierlösung A (ohne BSA):**

Durch Zugabe von 300 ml destilliertem Wasser sowie von 0,22 g D-Glucose zu 100 ml der vierfach konzentrierten Hanks-Lösung wurde die einfach konzentrierten Hanks-Lösung mit einer Glucosekonzentration von 2,8 mM erhalten. Diese wurde bei 20 °C unter Zugabe von 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,25 eingestellt.

**Präparierlösung B (mit BSA):**

Zur Herstellung der BSA-haltigen 2,8 mM Glucose-Hanks-Lösung wurden zu 350 ml der Präparierlösung A noch 1,22 g BSA (Fraktion V, 96 %) hinzugefügt. Diese sollte den Kollagenase-induzierten Verdau des Pankreas nach dem 10-minütigen Wasserbad stoppen.

**Kollagenase-Lösung zum Verdau des exokrinen Pankreas (ohne BSA):**

Um die Injektionslösung zum Verdau des exokrinen Teils des Pankreas und damit zur Isolation des endokrinen Anteils herzustellen, wurden zu der eiskalten Präparierlösung A 1 mg/ml Collagenase, welches von Clostridium histolyticum stammt, dazu gegeben. Außerdem wurde zur Sicherstellung einer optimalen Enzymaktivität noch 5,4 mM Calciumchlorid beigeetzt.

**Tabelle 12      Ansatz zur Herstellung der Kollagenase-Lösung zum Verdau des exokrinen Pankreas (ohne BSA)**

<b>Reagenzien</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Präparierlösung A	6,5 ml	
Collagenase	6,5 mg	1 mg/ml
Calciumchlorid-Lösung (1 M)	38 µl	5,4 mM

Sowohl der Hanks-Puffer als auch die Collagenase-Lösung wurden bis zu ihrer Verwendung im Rahmen der Isolation von Langerhans'schen Inselzellen der Maus auf Eis gestellt.

### **2.3.2 Präparation, Aufreinigung und Kultivierung der Inseln**

#### **Präparation:**

Nach Tötung der Maus wurde diese auf dem Rücken fixiert und das Abdomen durch einen Schnitt vom Becken zur Brust geöffnet. Die Bauchmuskulatur wurde ebenfalls eröffnet und der Processus Xiphoideus des Sternums entfernt. Das Duodenum wurde unter dem Binokular belichtet und das duodenale Ende des Gallengangs dargestellt. Die beiden an den Gang angrenzenden Enden des Zwölffingerdarms wurden abgeklemmt und dieser selbst so nah wie nur möglich an der Leber mittels Ligation verschlossen. Nun wurden über einen kleinen Schnitt in der Wand des Duodenums im Bereich der Papilla Vateri 3 ml der Collagenase-Lösung langsam mittels einer Spritze in das Pankreas injiziert. Die dadurch aufgeblasene Bauchspeicheldrüse wurde vorsichtig herauspräpariert, in einen 50 ml Falcon überführt und für 11 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, so dass das Gewebe verdaut wurde. Durch die Zugabe von 25 ml eiskaltem BSA-haltigen Hanks-Puffer wurde die Verdauungsreaktion wieder gestoppt.

#### **Aufreinigung:**

Nach der Zentrifugation für eine Minute bei 300 rpm wurde der Überstand verworfen und das Sediment zweimal gewaschen. Dabei wurde das Pellet aus Pankreasgewebe jeweils mit 5 ml eiskaltem BSA-haltigen Hanks-Puffer durch sechsmalige Aspiration mit einer 1,8-G Nadel resuspendiert, das verdaute Gewebe anschließend mit dem Puffer auf 30 ml aufgefüllt und für eine Minute bei 300 rpm zentrifugiert. Nach den beiden Waschschritten wurde der Überstand wieder verworfen, das Sediment in 5 ml kaltem Puffer resuspendiert und durch ein mit BSA-Hanks-Lösung angefeuchtetes Teesieb in eine saubere schwarze Petrischale überführt. Sowohl der Falcon als auch das Sieb wurden anschließend noch mit BSA-haltiger Hanks-Lösung gespült. Danach wurden die Inseln unter einem Binokular von dem restlichen exokrinen Pankreasgewebe getrennt. Dazu wurden die Inseln mittels einer 200 µl Pipette mit abgeschnittener Pipettenspitze je nach Verschmutzungsgrad zwei bis viermal in eine neue saubere schwarze Petrischale mit frischer Präparationslösung B überführt. Nachdem kein exokrines Pankreasgewebe mehr sichtbar war, wurden die Inseln zu je maximal 150 Stück in ein Eppendorfgefäß gegeben.

**Kultivierung:**

Zur Kultivierung der isolierten und aufgereinigten pankreatischen Mausinseln für 18 bis 22 Stunden wurde am Tag des Experiments folgendes Kulturmedium in einem 50 ml Falcon hergestellt:

**Tabelle 13      Ansatz zur Herstellung des Kulturmediums für die Inseln**

<b>Reagenzien</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
FCS (v/v)	5 ml	10 %
L-Glutamin (200 mM)	0,5 ml	2 mM
Hepes (1 M)	0,5 ml	10 mM
Natriumpyruvat (100 mM)	0,5 ml	1 mM
Penicillin/Streptomycin	0,5 ml	100 i.u. bzw. 100 µg/ml
RPMI 1640 (11 mM Glucose)	ad 50 ml	

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen auf der Sterilbank durchgeführt.

Das Kulturmedium wurde zu je 10 ml auf vier 15 ml Falcons verteilt und der Überstand der Inseln, die sich in der Zwischenzeit auf dem Boden des Gefäßes abgesetzt hatten, mit der Pipette abgenommen und verworfen. Die Inseln wurden nun auf das Medium des ersten Falcons geschichtet. Um dabei den Verlust von Inseln so gering wie möglich zu halten, wurde das Eppendorfgefäß mit 100 µl Kulturmedium aus dem ersten Falcon gespült, welches anschließend in diesen zurück gegeben wurde. Nach ca. fünf Minuten hatten sich die Inseln wieder vollständig am Boden abgesetzt (150 g in einer Minute bei Raumtemperatur) und der Überstand wurde abgesaugt. Die restliche Flüssigkeit mit den Inseln wurde vorsichtig aspiriert und auf das Medium im zweiten Falcon gegeben. Es wurde wieder ca. fünf Minuten gewartet bis die Inseln sedimentiert waren bevor der Überstand abgesaugt wurde. In eine kleine, nicht-haftende, sterile Petrischale (Typ 1008) wurden 2 ml des Kulturmediums vorgelegt und danach die Inseln in diese transferiert. Zum Schutz wurde die kleine Schale in eine große Petrischale gestellt. Diese wurde nun über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und am nächsten Tag für die Experimente bezüglich der Insulinsekretion verwendet.

## 2.4 Nachweis der Expression von GPR40

### 2.4.1 Isolation von RNA

Die Extraktion der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) über eine RNeasy Silicagel-Membran. Dabei wurde gleichzeitig ein DNase-Verdau der Proben durchgeführt, um eventuelle Kontaminationen mit DNA zu vermeiden. Verwendet wurden pankreatische Inseln von C57BL6/NCrl Mäusen, die bereits am Vortag isoliert und mit 600 µl RLT-Puffer und 6 µl Mercapthoethanol bei -20 °C eingefroren wurden. Anschließend wurden diese nach dem Protokoll des Herstellers weiter behandelt. Des Weiteren wurde die RNA von INS1- und MIN6-Zellen nach oben genanntem Protokoll isoliert.

Die RNA-Ausbeute wurde anhand eines Spektralphotometers von Eppendorf bestimmt, wobei die RNA 1:40 mit DNase freiem Wasser verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm, was dem Absorptionsmaximum von RNA entspricht, bestimmt wurde:

$$A_{260} = \epsilon \times c \times d$$

$$c = A_{260} / \epsilon \times d$$

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

$\epsilon$  = Extinctionskoeffizient für RNA (40 µg/ml)

$$IOD_{260} = 40 \text{ µg/ml RNA}$$

c = Konzentration

### 2.4.2 Herstellung von cDNA

Zur Synthese von cDNA aus RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase (Roche) wurden 1 µg RNA und das entsprechende Volumen DEPC-Wasser in ein Eppendorfgefäß pipettiert, um ein Endvolumen von 12,5 µl zu erhalten. Beträgt die Konzentration der RNA zum Beispiel 1 µg/µl, dann werden zu 1 µl der RNA-Lösung noch 11,5 µl DEPC-Wasser hinzugefügt.

Hierzu wurden nun 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer gegeben und dieses Gemisch für zwei Minuten auf 70 °C erhitzt, wodurch der Primer an das 3`-Ende des Poly-A-Schwanzes des mRNA-Moleküls binden kann. Anschließend wurden zu jedem Tube 6,5 µl eines

Mastermixes, der vorher bereits aus 5-fach-Puffer, dNTP-Mix, RNase Inhibitor, Reverse Transkriptase sowie Ampuwa Wasser hergestellt wurde, hinzugefügt und durch viermaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Das Reaktionsgemisch wurde dann für eine Stunde bei 42 °C inkubiert und zum Schluss wurde die Reaktion durch Erhitzung auf 94 °C für 5 Minuten gestoppt. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C eingefroren und gelagert.

**Tabelle 14**      **Ansatz des Mastermixes zur Herstellung von cDNA aus RNA**

<b>Reagenzien</b>	<b>Menge</b>
5x Puffer	4 µl
dNTP-Mix (10 mM; Endkonzentration 0,03 µg)	1 µl
RNase-Inhibitor (20 U für 1 µg cDNA)	0,5 µl
Reverse Transkriptase (2 U für 1 µg cDNA)	0,1 µl
Destilliertes Wasser	ad 6,5 µl

### **2.4.3 Primer-Design**

Die Generierung der Primer für die Amplifizierung eines Abschnitts der cDNA von GPR40/FFAR1 im Rahmen der PCR erfolgte über die „*Primer3 Output*“ Software ([www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_results.cgi](http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_results.cgi)). Dabei wurde darauf geachtet, dass der GC-Gehalt bei ca. 50 % liegt und sich die Schmelztemperaturen  $T_m$  der jeweils zusammengehörigen forward- und revers-Primer somit nicht wesentlich voneinander unterscheiden.  $T_m$  wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 2 \times (G + C) + 4 \times (A + T)$$

Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Länge der Primer zwischen 18 und 23 Basenpaaren liegt. Denn während zu kurze Primer mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit unspezifisch hybridisieren und dadurch falsche Abschnitte der cDNA amplifiziert werden, ist bei zu langen Primern eine vollständige Hybridisierung nur erschwert möglich.

Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen GMBH, Karlsruhe (Deutschland) synthetisiert und in einer Konzentration von 100 pmol/µl geliefert. Sie wurden vor Verwendung mit Ampuwa Wasser auf eine Konzentration von 50 µM verdünnt.

**Tabelle 15** Sequenzen und Eigenschaften der Primer zur Amplifizierung von GPR40/FFAR1

Probe	Bezeichnung der Primer	Sequenz (5' → 3')	GC [%]	T <sub>m</sub> [°C]	PCR-Produkt [bp]
Wtbl6 (Maus)	GPR40fw Maus b	TTTCATAAACCCGGACCTAGGA	45,5	68	90
	GPR40revMaus b	CCAGTGACCAGTGGGTTGAGT	57,1	60	
INS1 (Ratte)	GPR40fw Ratte a	CCTTTGGATACCAAGCCATC	50,0	59,4	169
	GPR40rev Ratte a	GAGCCATTCACGGGTATGTT	50,0	59,8	
MIN6 (Maus)	GPR40fw Maus b	TTTCATAAACCCGGACCTAGGA	45,5	68	90
	GPR40revMaus b	CCAGTGACCAGTGGGTTGAGT	57,1	60	
Positiv-Kontrolle	Beta-Aktin up	AGGCCGGCTTCGCGGGCGA	78,9	68	250
	Beta-Aktin down	TGCTCCTCAGGGGCCACACG	70,0	68	

#### 2.4.4 Polymerasekettenreaktion

Die PCR erlaubt mit Hilfe spezieller Enzyme eine zyklische *in-vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen aus einem geeigneten genetischen Ausgangsmaterial. Ein Zyklus setzt sich aus drei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten zusammen. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die doppelsträngige DNA durch eine Erhitzung auf 92 bis 98 °C in zwei Einzelstränge gespalten. Diese einzelsträngigen DNA-Moleküle dienen nun im zweiten Schritt, dem Annealing, als Matrize. Mit dieser hybridisieren bei einer Temperatur von 50 bis 65 °C die komplementären Primer. Die Annealing-Temperatur wird dabei von der jeweiligen Schmelztemperatur T<sub>m</sub> der Primer bestimmt. In der dritten und letzten Reaktion dieses Zyklus kommt es bei einer Temperatur von 72 °C zur Verlängerung der Primer (Extension) und damit zur Synthese der von ihnen eingeschlossenen Sequenz. Durch das zyklische Wiederholen der einzelnen Reaktionsschritte wird die spezifische DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert, da auch die neugebildeten Strängen als Matrize dienen. Es werden ca. 30 bis 35 Zyklen durchgeführt, so dass etwa 10<sup>8</sup> neue Kopien der spezifischen Ausgangssequenz entstehen. Diese können im Anschluss mittels DNA-Färbung und Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Beim Ansetzen der PCR wurde die DNA in PCR-Softstrips vorgelegt und ein Mastermix hergestellt, der anschließend zu der DNA pipettiert wurde. Außerdem wurde zu jedem PCR-Ansatz Beta-Aktin, welches der Überprüfung der Qualität der hergestellten cDNA diente, mitgeführt. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt.

**Tabelle 16 PCR-Ansatz zum Nachweis von GPR40**

	Menge	Endkonzentration
cDNA	2 µl	
Primer forward (50 µM)	1 µl	1 µM
Primer revers (50 µM)	1 µl	1 µM
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	
dNTP-Mix (10 mM)	8 µl	1,6 mM
10x Taq-Polymerase-Puffer	5 µl	
Magnesiumchlorid (25 mM)	5 µl	2,5 mM
Destilliertes Wasser	ad 50 µl	

Die Amplifikation im Rahmen der PCR erfolgte im Thermo Cycler.

**Tabelle 17 PCR-Programm zum Nachweis von GPR40/FFAR1**

Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
94	1`	1
94	30``	
60	30``	35
72	25``	
72	3`	1
4	∞	

### 2.4.5 Gel-Elektrophorese

Die analytische Auftrennung der vervielfältigten Abschnitte der cDNA erfolgte mittels der Agarose-Gelelektrophorese. Diese wandern durch die negative Ladung ihrer Phosphatgruppen im elektrischen Feld zur Anode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Größe und der Konformation der DNA-Fragmente sowie von den Pufferbedingungen, der angelegten Stromstärke und der Konzentration des Polysaccharids Agarose im Gel. Während für PCR-Produkte zwischen 200 und 300 bp 1,5 %ige Gele hergestellt werden, werden für DNA-Fragmente zwischen 100 bis 200 bp 2 %ige Gele verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht. Vor dem Gießen wurde der abgekühlten, noch flüssigen Agaroselösung Ethidiumbromid in einer Konzentration von 30 ng/µl zugesetzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und emittiert nach einer Anregung durch UV-Licht (254 bis 366 nm) Strahlen im orange-roten Bereich (590 nm) des sichtbaren Lichtspektrums. Auf diese Weise wurden die DNA-Banden nach elektrophoretischer Auftrennung unter einer UV-Lampe visualisiert und dokumentiert. Die Proben, welche jeweils mit 8 µl 6x Proben-

Ladepuffer (Carl Roth) versetzt wurden, sowie 5 µl eines 123 bp-Markers (Invitrogen) wurden auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und für eine Stunde bei 80 Volt aufgetrennt. Während das Glycerol des Ladepuffers die Dichte der DNA erhöht, womit ein Herausdiffundieren aus den Geltaschen vermieden werden soll, markiert Bromphenolblau die Lauffront im Gel, da dieser Farbstoff ebenfalls negativ geladen ist und somit im elektrischen Feld zur Anode wandert. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet.

## 2.5 Inkubation der INS-1E-Zellen

Zunächst wurden zwei verschiedene Stamm-Lösungen (1 und 2) hergestellt, die bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden konnten. Aus diesen wurde am Tag des Experiments, d.h. der Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen, die KRB-Lösung angesetzt. Diese wurde bei 20 °C unter Zugabe von 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

**Tabelle 18**      **Ansatz zur Herstellung der KRB-Lösung zur Inkubation von INS-1E-Zellen**

	<b>Reagenzien</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Stamm-Lösung 1	NaCl	35,4 g	135 mM
	KCl	1,77 g	4,8 mM
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,463 g	1,2 mM
	CaCl <sub>2</sub> (extra lösen)	735,1 mg	1,3 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	808 mg	1,2 mM
	Milipore-Wasser	ad 1 l	
Stamm-Lösung 2	NaCl	5,347 g	
	NaHCO <sub>3</sub>	2,625 g	5 mM
	Milipore-Wasser	ad 1 l	
KRB-Lösung	Stamm-Lösung 1	40 ml	
	Stamm-Lösung 2	32 ml	
	Hepes (1 M)	2 ml	
	BSA (V/FFA)	0,05/0,1/0,2/0,4 g	0,05/0,1/0,2/0,4 %
	Glucose-Lösung (1 M)	100 µl	0,5 mM
	Milipore-Wasser	ad 200 ml	

INS-1E-Zellen, deren Insulinsekretion unter dem Einfluss von Pertussistoxin untersucht wurden, wurden am Vortag der Inkubation mit den Testsubstanzen mit Pertussistoxin (100 ng/ml) über Nacht vorbehandelt.

Am Tag des Experiments wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit je 500 µl KRB-Lösung gewaschen. Nachdem die Waschlösung wieder abgesaugt war, wurden die

Zellen mit je 500 µl frischer KRB-Lösung für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad vorinkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit je 500 µl der Testlösungen für 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei war jeder Ansatz immer mindestens dreimal vertreten.

**Tabelle 19**      **Verwendete Testsubstanzen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Endkonzentrationen</b>
Adrenalin	1 µM
BSA V/FFA	0,05/0,1/0,2/0,4 %
BYK734	1/10 µM
Glucose	0,5/2,8/12 mM
GW9508	0,1/1/10 µM
Ölsäure	100/300 µM
Palmitinsäure	100/200/400 µM
Pertussistoxin	100 ng/ml
TUG-20	10 µM
TUG-178	10 µM
TUG-187	10 µM
TUG-221	10 µM
TUG-424	0,1/1/3/10 µM

**Tabelle 20**      **Beispielhafter Ansatz zur Inkubation der INS-1E-Zellen mit den Testsubstanzen**

<b>Well</b>	<b>Glucosekonzentration</b>	<b>Testsubstanz</b>
1-4	2,8 mM Glucose-KRB-Lösung	DMSO (1:1000; Kontrolle)
5-8	12 mM Glucose-KRB-Lösung	DMSO (1:1000; Kontrolle)
9-12	2,8 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 1
13-16	12 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 1
17-20	2,8 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 2
21-24	12 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 2
25-28	2,8 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 3
29-32	12 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 3
33-36	2,8 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 4
37-40	12 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 4
41-44	2,8 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 5
45-48	12 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 5

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Microwell-Platten zum Stoppen der Reaktion auf Eis gestellt. Anschließend wurden 400 µl des Überstandes abgenommen, dieser für vier Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und davon wiederum 300 µl Überstand abpipettiert und bei -20 °C eingefroren. Nachdem der restliche Überstand abgesaugt war, wurde der Zellrasen von je einem Well pro Reihe über Nacht bei 4 °C mit saurem Ethanol inkubiert. Dieses wurde am nächsten Tag ebenfalls abgenommen und bei -20 °C eingefroren.

**Tabelle 21      Ansatz zur Herstellung von saurem Ethanol**

Reagenzien	Menge
Salzsäure (37 %)	1,5 ml
Ethanol absolut	75 ml
Wasser	23,5 ml

## 2.6 Inkubation der Langerhans'schen Inselzellen der Maus

Für die Inkubation der Mausinseln wurde zunächst am Tag des Experiments die KRB-Lösung hergestellt. Diese entsprach in ihrer Zusammensetzung dem bei der Inkubation der INS-1E-Zellen genutztem KRB-Puffer. Nur die Konzentration von BSA (Fraktion V/FFA 0,5/0,2 %) sowie von Glucose (2,8 mM) unterschied sich. Auch diese wurde bei 20 °C unter Zugabe von 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

**Tabelle 22      Ansatz zur Herstellung der KRB-Lösung zur Inkubation der INS-1E-Zellen**

	Reagenzien	Menge	Endkonzentration
Stamm-Lösung 1	NaCl	35,4 g	135 mM
	KCl	1,77 g	4,8 mM
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,463 g	1,2 mM
	CaCl <sub>2</sub> (extra lösen)	735,1 mg	1,3 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	808 mg	1,2 mM
	Milipore-Wasser	ad 1 l	
Stamm-Lösung 2	NaCl	5,347 g	
	NaHCO <sub>3</sub>	2,625 g	5 mM
	Milipore-Wasser	ad 1 l	
KRB-Lösung	Stamm-Lösung 1	20 ml	
	Stamm-Lösung 2	16 ml	
	Hepes (1 M)	1 ml	
	BSA (V/FFA)	0,5/0,2g	0,5/0,2 %
	Glucose	55 mg	2,8 mM
	Milipore-Wasser	ad 100 ml	

Die Langerhans'schen Inselzellen wurden nach einer Inkubationszeit von 18 bis 22 Stunden aus dem Inkubator genommen und zu maximal 200 Stück in ein Eppendorfgefäß überführt. In diesem wurden sie zweimal mit je 1 ml 2,8 mmol/l Glucose-KRB-Lösung gewaschen. Dabei wurde gewartet bis sich die Inseln wieder am Boden abgesetzt hatten und dann der Überstand abgenommen. Danach wurden diese mit 1 ml der 2,8 mmol/l Glucose-KRB-Lösung für 60 Minuten bei 37 °C im Wasserbad vorinkubiert.

Anschließend wurden die Inseln zu je fünf Stück in 20 µl KRB-Lösung (2,8 mmol/l Glucose) aufgenommen und in 24 Eppendorfgefäße verteilt. Dabei wurde darauf

geachtet, dass die Größe der verteilten Inseln und somit deren Insulingehalt ähnlich war, damit die Wirkung der zu testenden Substanzen besser vergleichbar ist. Anschließend wurden je 500 µl der Testlösungen dazu gegeben und das Ganze eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Auch hier war jeder Ansatz immer mindestens dreimal vertreten.

**Tabelle 23      Verwendete Testsubstanzen**

Bezeichnung	Endkonzentrationen
BSA FFA	0,05/0,2 %
Glucose	2,8/6/12 mM
GW9508	1 µM
Palmitinsäure	50 µM
TUG-424	1/3 µM

**Tabelle 24      Beispielhafter Ansatz zur Inkubation der Mausinseln mit den Testsubstanzen**

Eppendorfgefäß	Glucosekonzentration	Testsubstanz
1-4	2,8 mM Glucose-KRB-Lösung	-
5-8	6 mM Glucose-KRB-Lösung	-
9-12	12 mM Glucose-KRB-Lösung	-
13-16	2,8 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 1
17-20	6 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 1
21-24	12 mM Glucose-KRB-Lösung	Testsubstanz 1

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Gefäße zum Stoppen der Reaktion auf Eis gestellt und kurz abzentrifugiert. Nun wurde der Überstand (400 der 520 µl) in neue Eppendorfgefäße überführt und bei -20 °C aufbewahrt. Weitere 70 µl des restlichen Überstandes wurden unter Ausschluss der Aufnahme von Inseln unter dem Binokular zusätzlich abgenommen und verworfen. Auf die Inseln wurden nun jeweils 500 µl saurer Ethanol gegeben, diese bei 4 °C über Nacht inkubiert und anschließend bei -20 °C eingefroren.

## 2.7 Insulinsekretion

### 2.7.1 Insulinbestimmung

Der Insulingehalt wurde mittels ELISA oder RIA im abgenommenen Überstand sowie nach Inkubation der Zellen bzw. Inseln mit saurem Ethanol über Nacht gemessen.

### 2.7.1.1 ELISA

Beim ELISA handelt es sich um ein antikörperbasiertes, enzymatisches Immunadsorptionsverfahren zum Nachweis von spezifischen Antigenen, wie Proteinen (zum Beispiel Antikörper), Viren, Hormonen (zum Beispiel Insulin), Toxinen und Pestiziden. Das nachzuweisende Antigen wird entweder direkt über die Polystyroloberfläche einer Mikrotiterplatte oder über den sogenannten spezifischen Erstantikörper, welcher selbst an eine Mikrotiterplatte gekoppelt ist, gebunden und angereichert. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen und ungebundene Bestandteile der Probe wieder entfernt. Nun erfolgt die Zugabe eines spezifischen, enzymmarkierten (zum Beispiel alkalische Phosphatase) Zweitantikörpers. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige Detektionsantikörper ausgewaschen. Anschließend wird ein zum Enzym passendes Substrat (zum Beispiel p-Nitrophenylphosphat) zugegeben. Die enzymatische Umsetzung des Substrats kann als Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz detektiert werden. Die Intensität der Farbe steigt dabei mit der Konzentration des entstandenen Reaktionsprodukts und ist direkt proportional mit der Menge des nachzuweisenden Antigens. Die Antigenkonzentration kann mittels Photometer und Standardreihe, welche aus Antigenverdünnungen bekannter Konzentration besteht, bestimmt werden.

Zur Messung von Insulin in Langerhans'schen Inselzellen der Maus sowie in INS-1E-Zellen wurde der „Ratten-Insulin ELISA“-Kit von Merckodia verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die zu messenden Lösungen mit Hanks-BSA (0,5 %, Fraktion V) -Puffer, der bei Raumtemperatur mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde, verdünnt. Alle Teströhrchen wurden sowohl vor Ansetzen der Verdünnungen als auch vor Durchführung des ELISA gevortext. Die Verdünnung, der mit saurem Ethanol inkubierten Inseln, erfolgte in zwei Schritten. Auf eine erste Vorverdünnung von 1:10 folgte eine zweite Verdünnung von 1:500 bzw. 1:1000.

### **2.7.1.2 Radioimmunoassay**

Der RIA dient der quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen und beruht auf der Konzentrationsmessung eines radioaktiv markierten Antigens, welcher mit dem zu messenden natürlichen Antigen, wie Arzneimittel, Hormone, Enzyme, Tumormarker, DNA oder Viren, in Konkurrenz steht. Dazu wird das nachzuweisende Antigen mit einer bekannten Konzentration an radioaktiv markiertem Antigen und spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Antikörper haben dabei zu beiden Antigenen die gleiche Bindungsaffinität. Je mehr natürliche Antigene vorhanden sind, desto weniger radioaktiv markierte Antigene werden gebunden. Nach der Inkubationsphase werden die ungebundenen Antigene durch einen Waschschrift entfernt. Je geringer nun die nachgewiesene Radioaktivität ist, d.h. umso weniger radioaktiv markierte Antigene gebunden sind, desto größer ist die Konzentration an dem zu messendem Antigen.

Zur Messung der Insulinsekretion in INS-1E-Zellen wurde ein „Ratten-Insulin RIA“-Kit verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt..

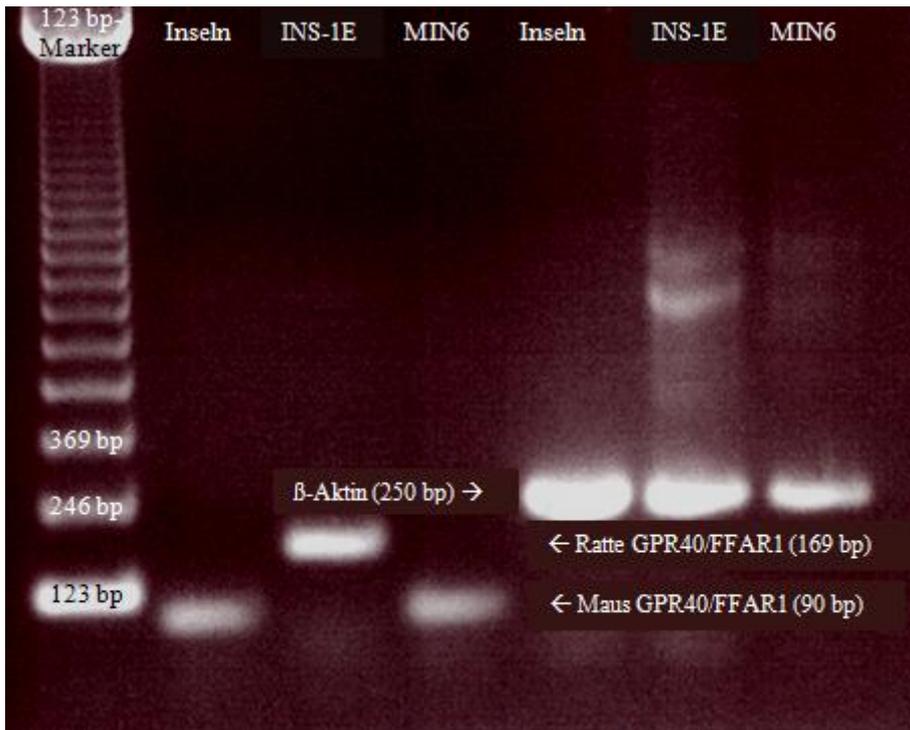
### **2.7.2 Statistik**

Für die statistische Analyse der Beeinflussung der Insulinsekretion durch die verschiedenen Testsubstanzen wurden immer mindestens 3 identische und voneinander unabhängig durchgeführte Versuche ausgewertet. Die Analyse erfolgte mit dem t-Test für unabhängige Proben. Dieser untersucht die Nullhypothese, die besagt, dass zwei Stichproben aus Populationen mit dem gleichen Mittelwert stammen. Ein p-Wert von weniger als 0,05 wurde als „signifikant“ und von weniger als 0,005 als „hochsignifikant“ bezeichnet. Die Signifikanzprüfung drückt dabei die Irrtumswahrscheinlichkeit aus, wenn der angetroffene Unterschied auf alle Lebewesen, d.h. die Grundgesamtheit aus der die Stichprobe stammt, verallgemeinert wird.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Expressionsnachweis von GPR40/FFAR1**

Es ist bereits bekannt, dass GPR40/FFAR1 vor allem in den Betazellen des Pankreas, aber auch im Gehirn und in den Monozyten exprimiert wird [63; 122-125]. Da im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von GPR40/FFAR1 auf die GSIS untersucht werden sollte, wurde zunächst ein Expressionsnachweis in den verwendeten Zelllinien sowie Langerhans'schen Inselzellen der Maus mittels RT-PCR erbracht. Die dabei eingesetzten Primer wurden so gewählt, dass sie innerhalb der codierenden Region der mRNA-Sequenz von GPR40/FFAR1 hybridisieren und die Amplifikation eines kleinen Bereiches ermöglichen. Das für die INS-1E-Zellen, die aus einer pankreatischen, tumoralen Zelllinie der Ratte entstanden sind, erwartete PCR-Produkt war 169 bp groß. Für Inseln und MIN6-Zellen der Maus war das erwartete Segment 90 bp lang. Außerdem wurde zur Überprüfung der Qualität der cDNA in allen drei Proben eine 250 bp große mRNA-Sequenz von  $\beta$ -Aktin amplifiziert. Mittels der Gel-Elektrophorese konnten auf einem 2 %igem Agarosegel in allen Proben die erwarteten PCR-Produkte nachgewiesen werden.



**Abbildung 1 Nachweis von GPR40/FFAR1**

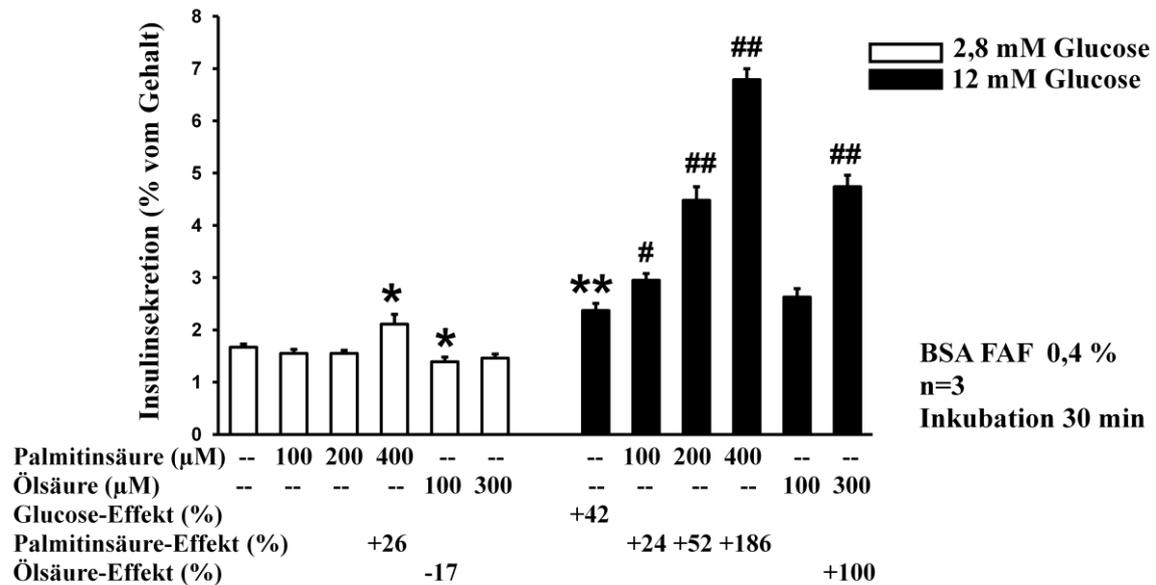
Der Nachweis von GPR40/FFAR1 erfolgte in der cDNA von murinen Langerhans'schen-Inselzellen, INS-1E-Zellen und MIN6-Zellen. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 %igem Agarosegel aufgetrennt. Als Marker wurde ein 123 bp-Längenstandard verwendet. Die Größen der amplifizierten PCR-Produkte sind neben den entsprechenden Banden in Basenpaaren (bp) angegeben.

## **3.2 Effekte der Aktivierung von GPR40/FFAR1 auf die Insulinsekretion in insulinsezernierenden Zellen**

### **3.2.1 Fettsäure-induzierte Insulinsekretion in INS-1E-Zellen**

Physiologische Agonisten von GPR40/FFAR1 sind langkettige Fettsäuren, wie Palmitinsäure und Ölsäure [62; 63; 125; 135; 137]. Um den Einfluss von neuen spezifischen GPR40/FFAR1-Agonisten auf die Insulinsekretion zu untersuchen, wurde ihre Wirkung mit den Effekten von Palmitinsäure und Ölsäure verglichen. Zunächst wurden Sekretionsversuche mit der Glucose-sensitiven, insulinsezernierenden INS-1E-Zelllinie, die GPR40/FFAR1 exprimiert, durchgeführt. Fettsäuren sind nur bedingt wasserlöslich und binden an Albumin, so dass die freie und die eingesetzte Konzentration von Fettsäuren von der Albuminkonzentration abhängig ist. Da das meist

für Sekretionsversuche von Insulin verwendete Albumin (BSA der Fraktion V), welches die Degradation und unspezifische Bindung des Hormons an die Gefäßoberfläche verhindern soll, Fettsäuren enthält, wurden die Versuche mit fettsäurefreiem BSA (BSA FAF) in einer Konzentration von 0,4 % durchgeführt. In einer 0,4 %igen BSA-Lösung können bis zu 600  $\mu\text{M}$  Palmitinsäure gelöst werden. INS-1E-Zellen wurden für 30 Minuten mit Glucose (2,8 und 12 mM) und ansteigenden Fettsäurekonzentrationen (Palmitinsäure (100/200/400  $\mu\text{M}$ ) und Ölsäure (100/300  $\mu\text{M}$ )) inkubiert (Abbildung 2). Dabei erhöhte 400  $\mu\text{M}$  Palmitinsäure die basale Sekretion unter 2,8 mM Glucose signifikant um 26 %, während 100 und 200  $\mu\text{M}$  keinen Effekt hatten. Ölsäure 100  $\mu\text{M}$  erniedrigte die basale Sekretion signifikant um 17 %, Ölsäure 300  $\mu\text{M}$  hatte dagegen keinen Einfluss. Glucose (12 mM) stimulierte die Insulinsekretion hochsignifikant um 42 %. In Anwesenheit von 12 mM Glucose wurde die Sekretion durch Palmitat (100  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  +24 %, 200  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  +52 %, 400  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  +186 %) und Ölsäure (300  $\mu\text{M}$   $\rightarrow$  +100 %) weiter stimuliert. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die gesättigte als auch die ungesättigte Fettsäure die Insulinsekretion glucoseabhängig potenzieren.



**Abbildung 2 Einfluss von Palmitinsäure und Ölsäure auf die Insulinsekretion**

Die Insulinsekretion wurde von vor 2 Tagen ausgesäten (150.000 Zellen/Well), 2 Tage kultivierten und für 30 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten INS-1E-Zellen bestimmt.

Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

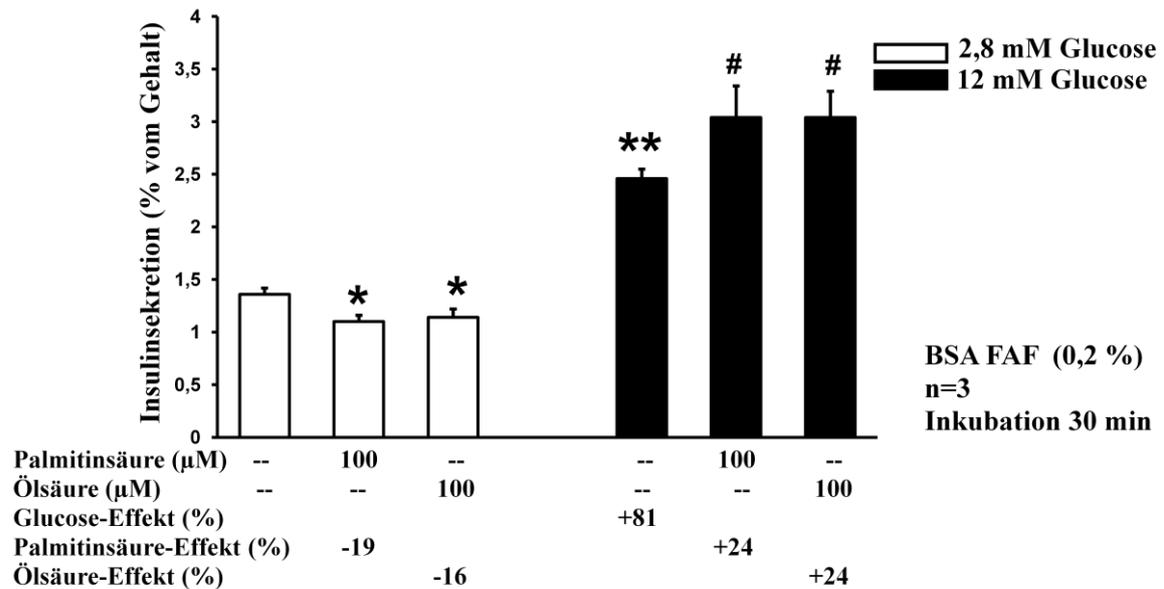
\* zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

# zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

## zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

Da die Wirkung auf GPR40/FFAR1 von der BSA-Konzentration abhängig ist [63], wurde die Wirkung von 100 μM Palmitinsäure und Ölsäure auch in Anwesenheit von 0,2 % BSA untersucht (Abbildung 3). Interessanterweise erniedrigten beide Fettsäuren die basale Sekretion signifikant, während sie in Anwesenheit von 12 mM Glucose die Sekretion um jeweils 24 % signifikant steigerten. Glucose (12 mM) stimulierte in diesen Versuchen die Insulinsekretion ebenfalls hochsignifikant um 81 %. Die Erniedrigung der BSA-Konzentration um die Hälfte hat die Effekte von Palmitinsäure und Ölsäure in diesen Versuchen somit nicht wesentlich verstärkt.



**Abbildung 3 Einfluss von Palmitinsäure und Ölsäure auf die Insulinsekretion**

Die Insulinsekretion wurde von vor 2 Tagen ausgesät (150.000 Zellen/Well), 2 Tage kultiviert und für 30 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten INS-1E-Zellen bestimmt.

Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

\* zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

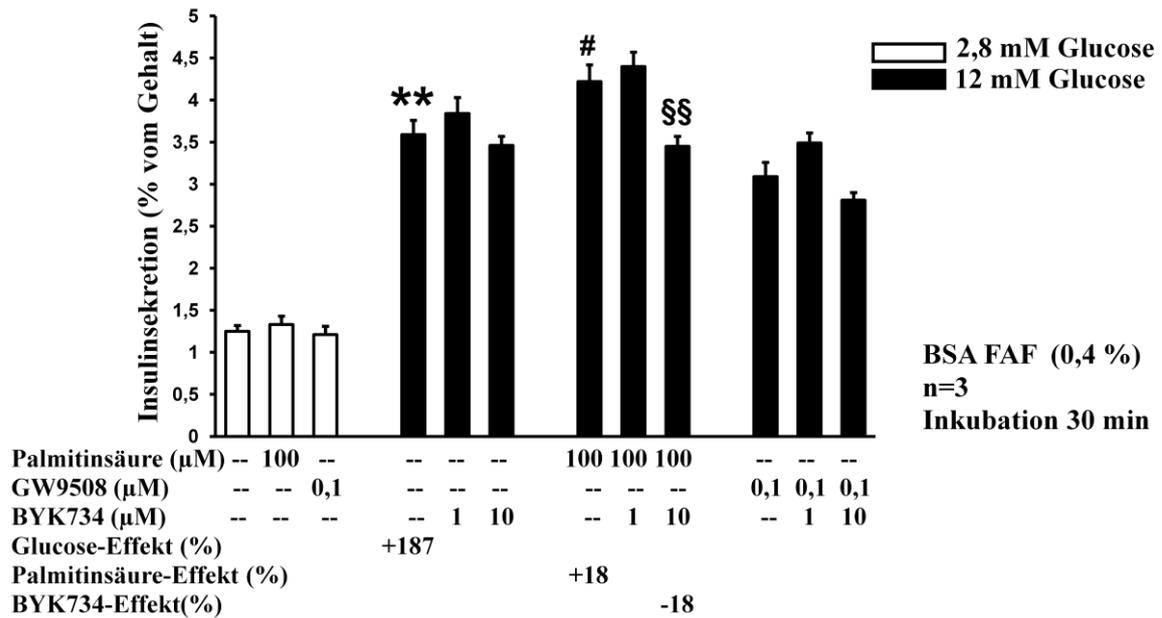
\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

# zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

### 3.2.2 Effekt von GW9508 auf die Insulinsekretion in INS-1E-Zellen

Im nächsten Versuchsansatz wurde untersucht, welchen Einfluss die Stimulation von GPR40/FFAR1 auf die Insulinsekretion haben kann. Zum einen wurde versucht, den Effekt von Palmitinsäure mit dem GPR40/FFAR1-Antagonisten BYK734 zu hemmen, zum anderen mit dem bereits charakterisierten GPR40/FFAR1-Agonisten GW9508 zu vergleichen (Abbildung 4). Diese Versuche wurden bei 0,4 % BSA und mit 100 µM Palmitinsäure durchgeführt. Weder Palmitinsäure noch GW9508 hatten einen Effekt auf die basale Sekretion. Glucose stimulierte die Sekretion wiederum hochsignifikant um 187 %. Palmitinsäure erhöhte die Sekretion um weitere 18 % zwar nur geringfügig, jedoch signifikant. Diese Erhöhung wurde vollständig und hochsignifikant durch BYK734 in der hohen Konzentration von 10 µM gehemmt. In einer Konzentration von 1 µM zeigte der Antagonist dagegen keine Wirkung. GW9508 hatte in einer Konzentration von 0,1 µM keinen Einfluss auf die GSIS und auch BYK734 veränderte

die Sekretion nicht. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Palmitinsäure die GSIS über Aktivierung von GPR40/FFAR1 steigert.



**Abbildung 4 Einfluss von Palmitinsäure, GW9508 und BYK734 auf die Insulinsekretion**

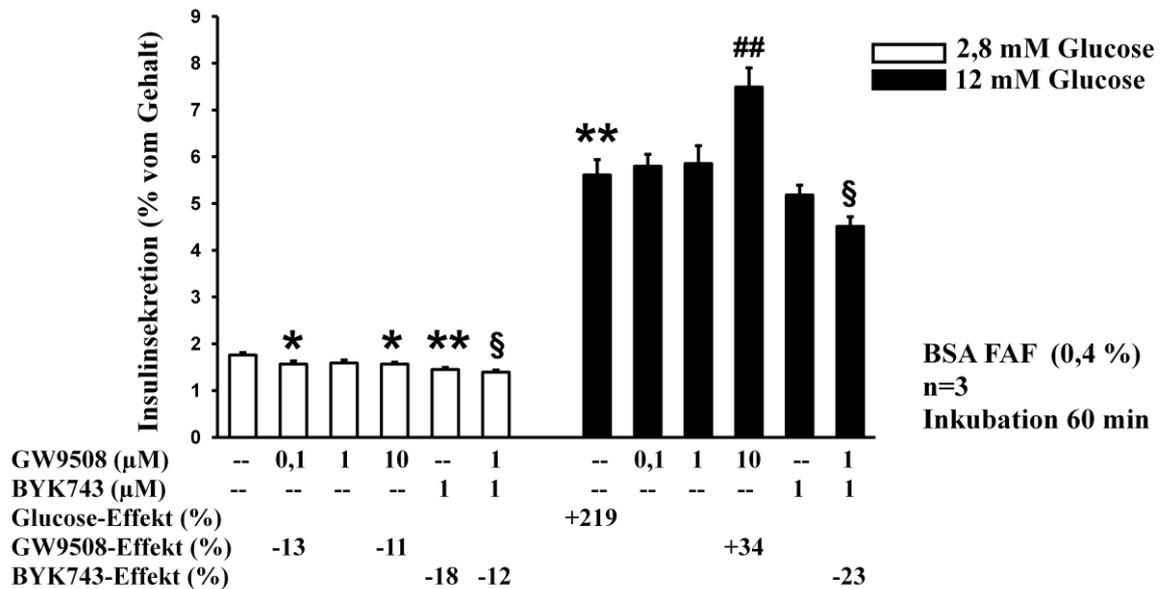
Die Insulinsekretion wurde von vor 2 Tagen ausgesät (150.000 Zellen/Well), 2 Tage kultiviert und für 30 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten INS-1E-Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

# zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

§§ zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der gleichen Bedingung ohne BYK734 an.

Da GW9508 in einer Konzentration von 0,1 µM keinen Effekt auf die Sekretion hatte, wurde der GPR40/FFAR1-Agonist anschließend in höheren Konzentrationen getestet (Abbildung 5). Erst in einer Konzentration von 10 µM stimulierte GW9508 die GSIS hochsignifikant um 34 %. Obwohl 1 µM GW9508 die Sekretion nicht signifikant steigerte, war nach Zugabe von 1 µM BYK734 die Sekretion interessanterweise um 23 % signifikant erniedrigt.



**Abbildung 5 Einfluss von GW9508 und BYK743 auf die Insulinsekretion**

Die Insulinsekretion wurde von vor 2 Tagen ausgesät (150.000 Zellen/Well), 2 Tage kultiviert und für 60 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten INS-1E-Zellen bestimmt.

Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

\* zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

# zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

## zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

§ zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber 1 μM GW9508 der gleichen Glucosekonzentration an.

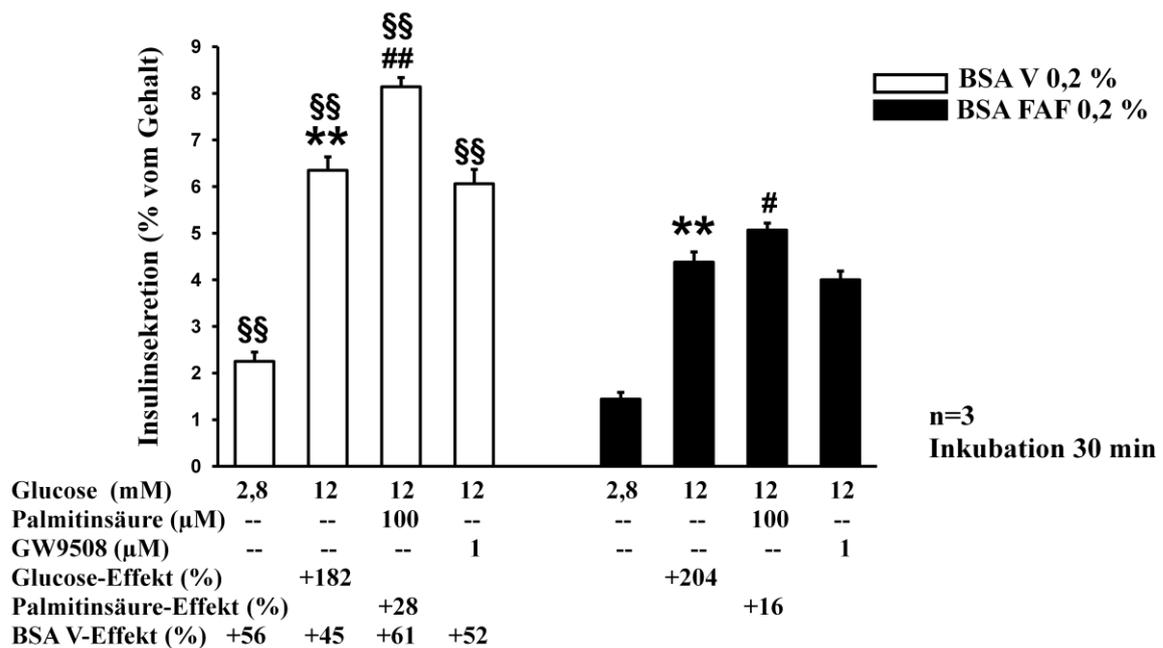
### 3.2.3 Effekt von BSA auf die Insulinsekretion in INS-1E-Zellen

Da Albumin die Stimulation von GPR40/FFAR1 beeinflusst, wurde in weiteren Versuchen die Wirkung von BSA auf die Insulinsekretion untersucht. Zunächst wurde BSA der Fraktion V mit fettsäurefreiem BSA in einer Konzentration von 0,2 % verglichen (Abbildung 6).

Während die basale Sekretion unter BSA der Fraktion V im Vergleich zu fettsäurefreiem BSA hochsignifikant stärker war, konnte bei BSA FFA ein prozentual stärkerer Anstieg der GSIS gemessen werden.

Dabei steigerte Glucose 12 mM die Insulinfreisetzung jedoch bei beiden BSA-Präparationen hochsignifikant um ca. das Dreifache. Des Weiteren stimulierte

Palmitinsäure die GSIS bei fettsäurefreiem BSA signifikant und bei BSA der Fraktion V sogar hochsignifikant. GW9508 hatte in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  keinen Effekt auf die Insulinfreisetzung. Insgesamt war die Sekretion unter BSA der Fraktion V im Vergleich zu fettsäurefreiem BSA hochsignifikant stärker. Obwohl BSA die Höhe der Sekretion beeinflusst, war in Anwesenheit von fettsäurefreiem BSA der Glucoseeffekt, jedoch nicht die stimulierende Wirkung von Palmitinsäure auf die GSIS verbessert.



**Abbildung 6** Effekt von BSA V und BSA FAF auf den Einfluss von Palmitinsäure und GW9508 auf die Insulinsekretion.

Die Insulinsekretion wurde von vor 2 Tagen ausgesät (150.000 Zellen/Well), 2 Tage kultiviert und für 30 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten INS-1E-Zellen bestimmt.

Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) bei gleichem BSA an.

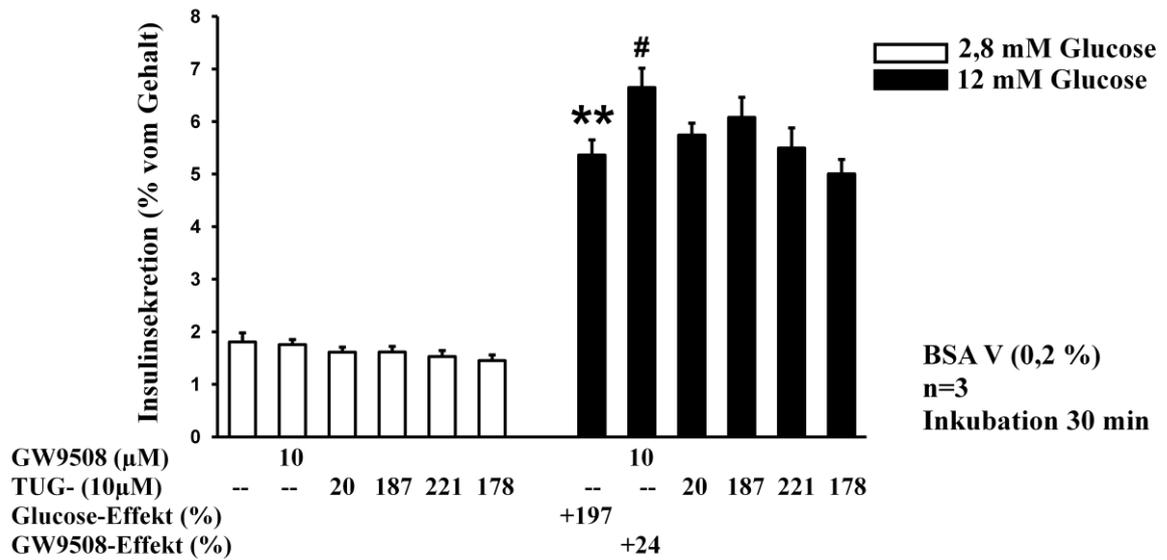
# zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM bei gleichem BSA an.

## zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM bei gleichem BSA an.

§§ zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der gleichen Bedingung bei der jeweils anderen BSA-Substanz an.

### **3.2.4 Effekt von neuen spezifischen GPR40/FFAR1-Agonisten und -Antagonisten auf die Insulinsekretion in INS-1E-Zellen**

Neben dem käuflichen Agonisten GW9508 wurden eine Reihe von neu synthetisierten Substanzen von Trond Ulven (Southern University von Dänemark) zur Verfügung gestellt, die in einem Expressionssystem bereits auf ihre Bindung an GPR40/FFAR1 untersucht worden waren. Diese Substanzen wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal hinsichtlich ihrer Wirkung auf endogen exprimierte Rezeptoren in insulinsezernierenden INS-1E-Zellen untersucht (Abbildung 7 und 8). Die sekretionssteigernde Wirkung wurde wiederum in Anwesenheit von 0,2 % BSA der Fraktion V bzw. fettsäurefreiem BSA sowie der synthetischen Substanzen in einer maximalen Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  getestet. Die drei neuen Agonisten TUG-20, -187 und -221 steigerten die basale Insulinsekretion nicht. In Anwesenheit von fettsäurefreiem BSA hatten die beiden Agonisten TUG-187 und TUG-221 sogar einen signifikant hemmenden und der Antagonist TUG-178 einen hochsignifikant hemmenden Effekt auf die basale Freisetzung. GW9508 stimulierte die GSIS nur in Anwesenheit von BSA der Fraktion V signifikant. Die neu synthetisierten Substanzen von Trond Ulven hatten dagegen keinen Effekt auf die GSIS. Die Ergebnisse zeigen, dass unter den gewählten Bedingungen die neuen GPR40/FFAR1-Agonisten und auch der Antagonist die GSIS nicht beeinflussen.



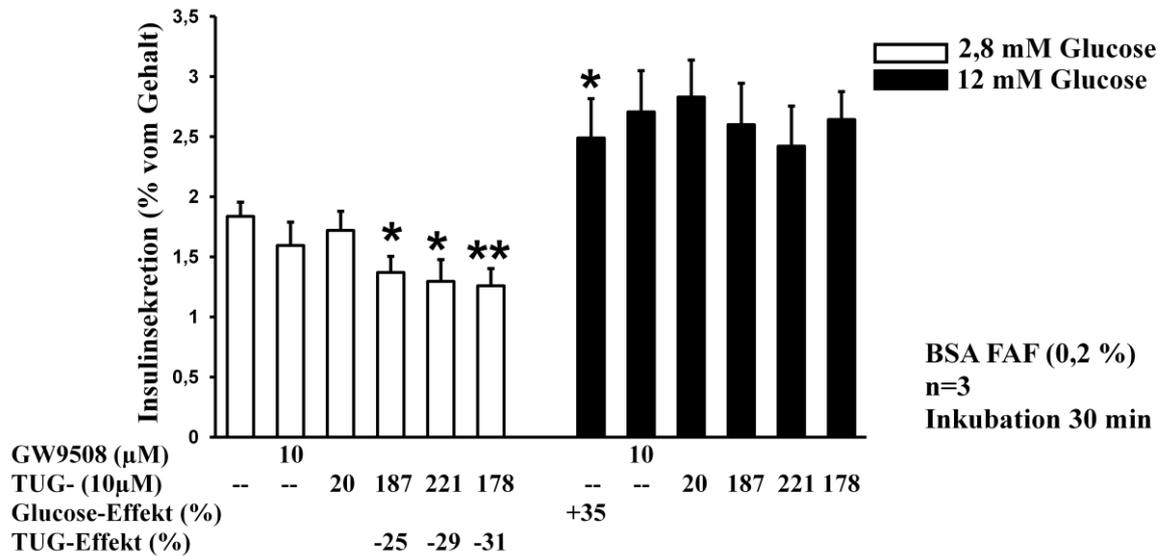
**Abbildung 7 Einfluss von neuen spezifischen GPR40/FFAR1-Agonisten und -Antagonisten auf die Insulinsekretion**

Die Insulinsekretion wurde von vor 2 Tagen ausgesät (150.000 Zellen/Well), 2 Tage kultiviert und für 30 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten INS-1E-Zellen bestimmt.

Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

# zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.



**Abbildung 8 Einfluss von neuen spezifischen GPR40/FFAR1-Agonisten und -Antagonisten auf die Insulinsekretion**

Die Insulinsekretion wurde von vor 2 Tagen ausgesät (150.000 Zellen/Well), 2 Tage kultiviert und für 30 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten INS-1E-Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

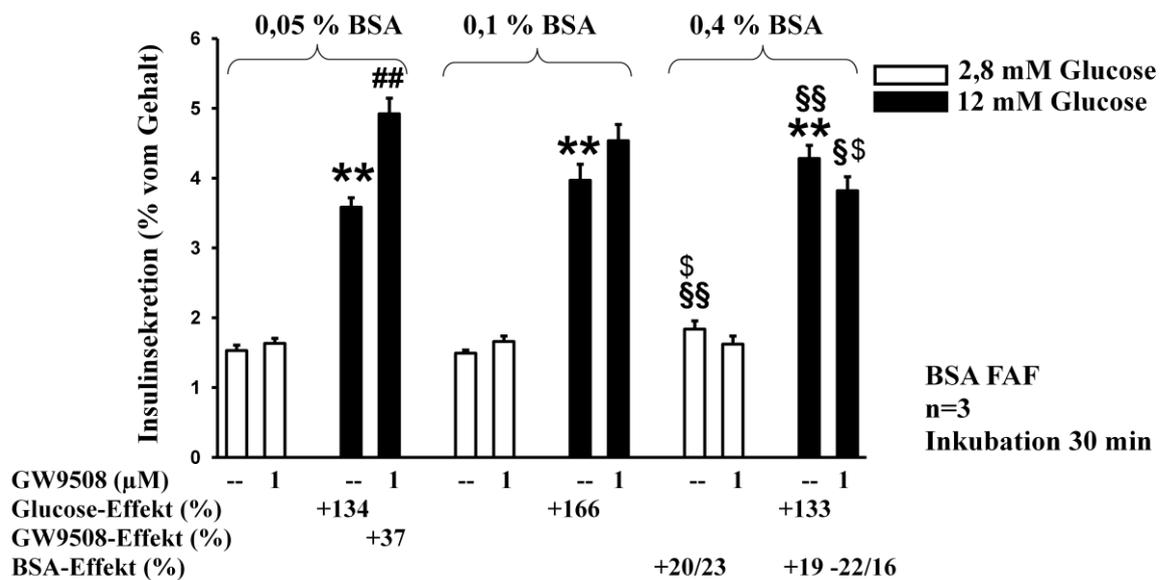
\* zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

### 3.2.5 Effekt verschiedener BSA-Konzentrationen auf die Insulinsekretion in INS-1E-Zellen

In weiteren Versuchen wurde nun untersucht, ob sich die Konzentration von fettsäurefreiem BSA auf den Einfluss von GW9508 auf die GSIS auswirkt (Abbildung 9 und 10). Während der Agonist sowohl bei 0 % als auch bei 0,05 % BSA die GSIS signifikant steigerte, hatte dieser bei BSA-Konzentrationen  $\geq 0,1$  % keinen Effekt auf die Insulinfreisetzung. Interessanterweise konnte die stimulierende Wirkung von GW9508 in BSA-freier Lösung nur in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , nicht aber bei 10  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Bei 0,05 % BSA zeigte sich dagegen bei beiden Konzentrationen ein ähnlich starker Anstieg der GSIS. Des Weiteren war bei einer BSA-Menge von 0,4 % sowohl die basale als auch die GSIS hochsignifikant stärker gegenüber der Freisetzung bei BSA 0,05 %. Im Vergleich zur Insulinfreisetzung bei 0,1 % BSA war dagegen nur die basale Sekretion signifikant größer. Außerdem bewirkte der Agonist GW9508 bei BSA 0,4 % sogar eine signifikante Abnahme der

GSIS im Vergleich zu niedrigeren BSA-Konzentrationen. Weiterhin war bei einer BSA-Konzentration von 0,05 % die basale Insulinsekretion signifikant stärker und die GSIS hochsignifikant vermindert gegenüber der Freisetzung bei BSA-freier Lösung. Diese Versuche zeigen, dass sich eine BSA-Konzentration  $\geq 0,1$  % hemmend auf den Agonisten auswirkt. Der maximale Effekt von GW9508 konnte bei einer BSA-Konzentration von 0,05 % beobachtet werden und lag bei einer Zunahme der GSIS von 37 %.



**Abbildung 9** Effekt verschiedener BSA-Konzentrationen auf den Einfluss von GW9508 auf die Insulinsekretion

Die Insulinsekretion wurde von vor 2 Tagen ausgesät (150.000 Zellen/Well), 2 Tage kultiviert und für 30 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten INS-1E-Zellen bestimmt.

Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

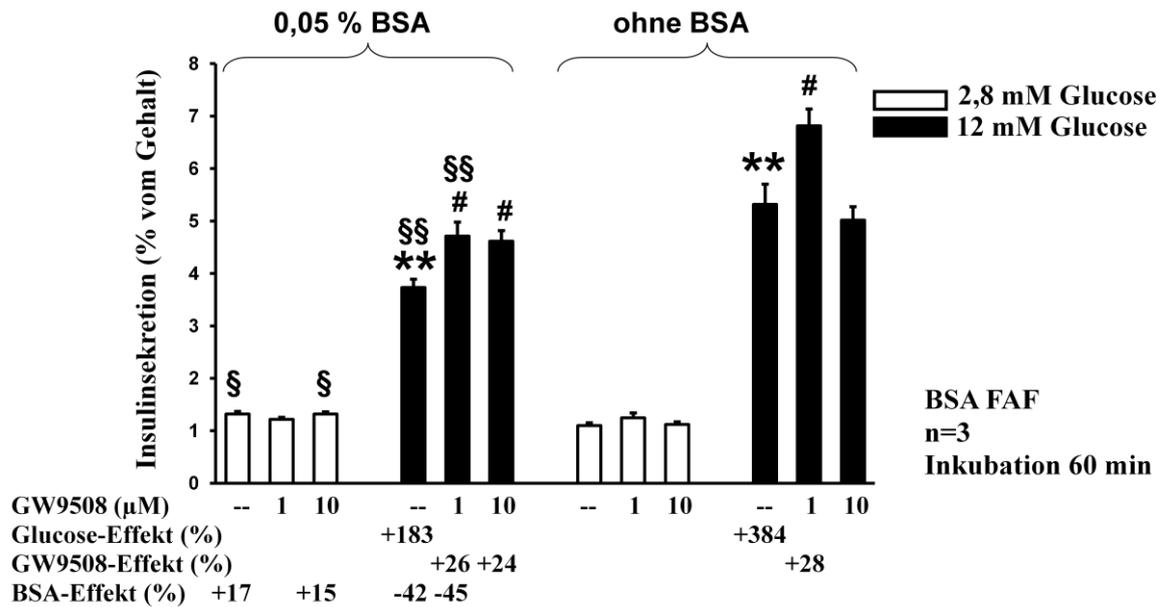
\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

## zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

§ zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der gleichen Bedingung bei 0,05 % BSA an.

§§ zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der gleichen Bedingung bei 0,05 % BSA an.

\$ zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der gleichen Bedingung bei 0,1 % BSA an.



**Abbildung 10** Effekt des Fehlens von BSA auf den Einfluss von GW9508 auf die Insulinsekretion

Die Insulinsekretion wurde von vor 2 Tagen ausgesät (150.000 Zellen/Well), 2 Tage kultiviert und für 60 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten INS-1E-Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

# zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

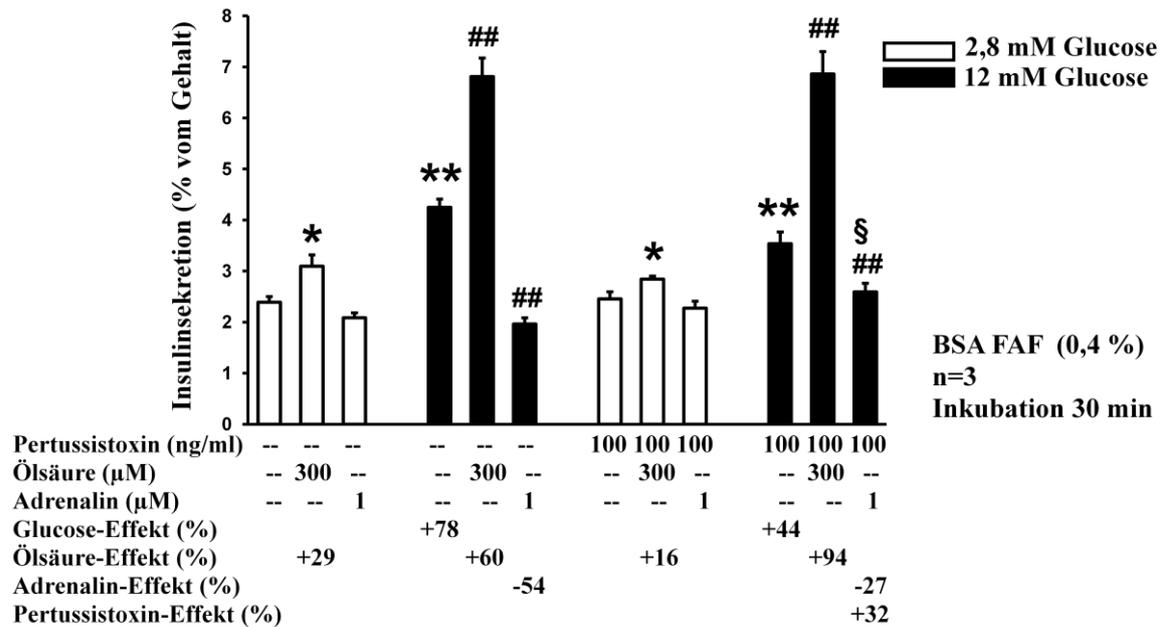
§ zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der gleichen Bedingung bei 0 % BSA an.

§§ zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der gleichen Bedingung bei 0 % BSA an.

### 3.2.6 Effekt der Hemmung von Gi auf die Insulinsekretion in INS-1E-Zellen

Da gezeigt wurde, dass GPR40/FFAR1-Rezeptoren nicht nur an Gq-, sondern auch an Gi-Proteine binden, ist es denkbar, dass GPR40/FFAR1-Agonisten simultan sowohl sekretionsstimulierende Signalwege über Gq als auch sekretionshemmende Signalwege über Gi aktivieren. Eine derartige duale Wirkung könnte die schlechte stimulierende Wirkung der getesteten, synthetisch hergestellten Substanzen auf die Sekretion erklären. Deswegen wurde im folgenden Versuch die Hemmung über Gi durch Vorbehandlung der INS-1E-Zellen mit Pertussistoxin ausgeschaltet (Abbildung 11). Um den Effekt von Pertussis Toxin zu kontrollieren, wurde die hemmende Wirkung von Adrenalin auf die Sekretion untersucht. In Zellen, die mit Pertussistoxin vorbehandelt wurden, kann Adrenalin die Sekretion nicht mehr hemmen [107]. Außerdem wurde untersucht, ob

Pertussistoxin auch die Wirkung von Ölsäure auf die Insulinfreisetzung beeinflussen kann. Dabei führte Ölsäure sowohl mit als auch ohne Pertussistoxin zu einer signifikanten Zunahme der basalen Sekretion. Auch die GSIS wurde durch Ölsäure unabhängig von Pertussistoxin hochsignifikant um weitere 60 % (ohne Pertussistoxin) bzw. 94 % (mit Pertussistoxin) erhöht. Interessanterweise konnte kein signifikanter Einfluss des Toxins auf den Effekt von Ölsäure beobachtet werden. Adrenalin führte zu einer hochsignifikanten Hemmung der GSIS, jedoch war der Effekt in Anwesenheit von Pertussistoxin signifikant geringer. Glucose (12 mM) stimulierte die Insulinsekretion ebenfalls unabhängig von Pertussistoxin hochsignifikant. Die Ergebnisse zeigen, dass Pertussistoxin zwar den Adrenalin-, nicht aber den Glucose- und Ölsäure-Effekt beeinflusst.



**Abbildung 11** Effekt von Pertussistoxin auf den Einfluss von Ölsäure und Adrenalin auf die Insulinsekretion.

Die Insulinsekretion wurde von vor 2 (150.000 Zellen/Well) bzw. 3 Tagen (75.000 Zellen/Well) ausgesäen, 2 bzw. 3 Tage kultivierten und für 30 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten INS-1E-Zellen bestimmt.

Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

\* zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

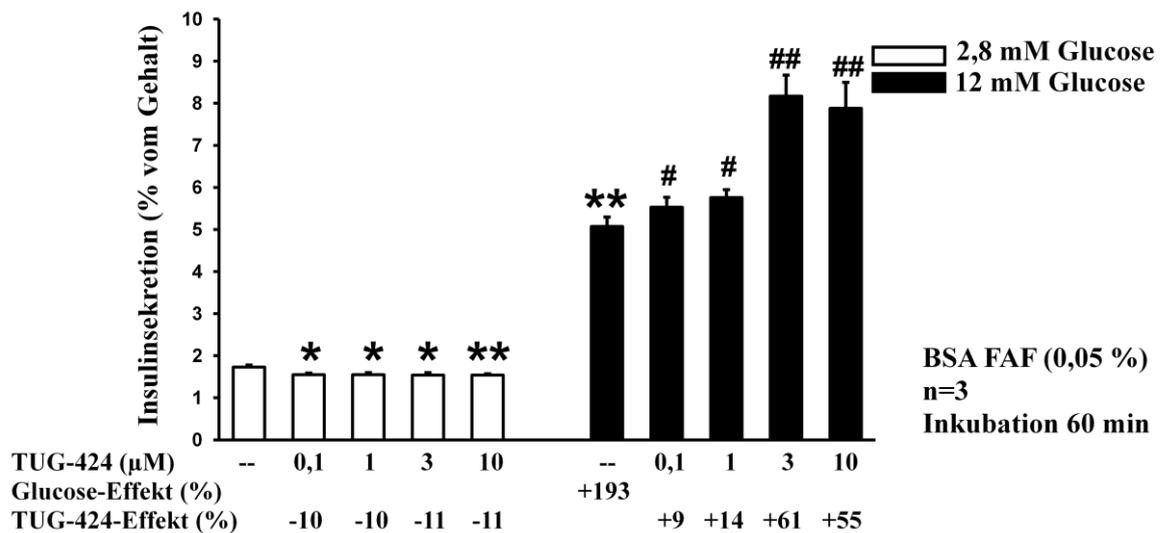
## zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

§ zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der gleichen Bedingung ohne Pertussistoxin an.

### 3.2.7 Effekt von TUG-424 auf die Insulinsekretion in INS-1E-Zellen

Effekte eines weiteren potentiellen GPR40/FFAR1-Agonisten (TUG-424) auf die Insulinsekretion wurden nun bei 0,05 % fettsäurefreiem BSA (Abbildung 12) und ohne die Zugabe von BSA getestet (Abbildung 13). In diesem Fall wurde das Albumin erst unmittelbar nach dem Inkubationsstopp der Lösung zugegeben, um einem unspezifischen Verlust von sezerniertem Insulin vorzubeugen. Zunehmende Konzentrationen (100 nM bis 10 µM) des potentiellen Agonisten TUG-424 verbesserten die GSIS sowohl in Anwesenheit von 0,05 % BSA als auch bei BSA-freier Lösung bereits signifikant bei einer Konzentration von 100 nM und mit einem maximalen,

hochsignifikanten Effekt bei 3  $\mu\text{M}$ . Interessanterweise war die basale Insulinsekretion bei 2,8 mM Glucose in Gegenwart von BSA zwar nur leicht, aber signifikant erniedrigt. Fehlte BSA, hatte TUG-424 keinen Einfluss auf die basale Freisetzung. TUG-424 stimulierte die Insulinsekretion glucose- und konzentrationsabhängig mit einem maximalen Effekt von 60 % bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$ . Diese beinahe zweifache Steigerung der GSIS in Gegenwart von 12 mM Glucose ist dabei vergleichbar mit dem maximalen Effekt von Palmitinsäure (400  $\mu\text{M}$  in 0,4 % BSA) in Gegenwart der gleichen Glucosekonzentration.



**Abbildung 12 Einfluss von TUG-424 auf die Insulinsekretion**

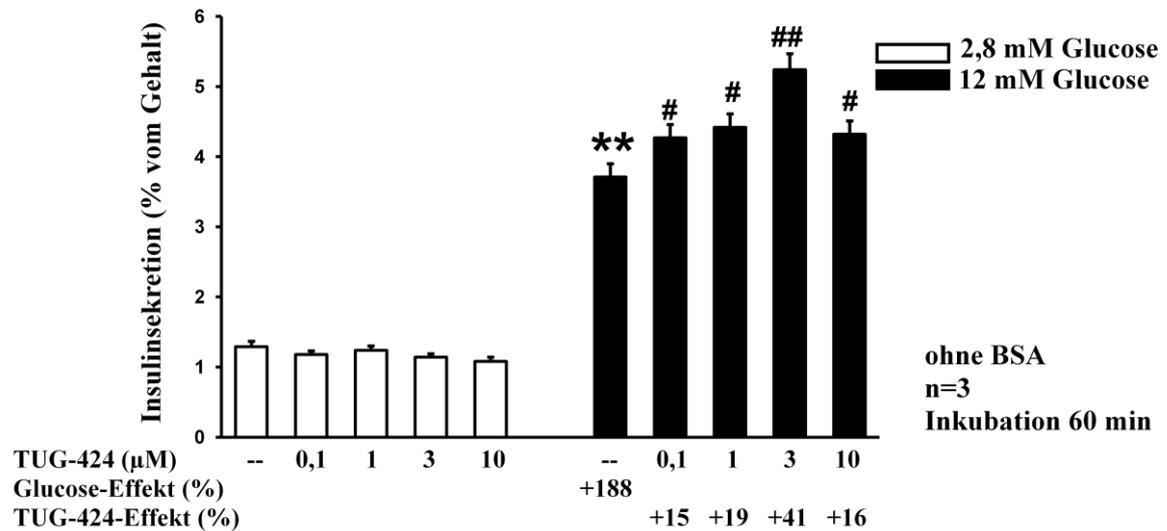
Die Insulinsekretion wurde von vor 2 Tagen ausgesät (150.000 Zellen/Well), 2 Tage kultiviert und für 60 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten INS-1E-Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

\* zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

# zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

## zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.



**Abbildung 13 Einfluss von TUG-424 auf die Insulinsekretion**

Die Insulinsekretion wurde von vor 2 Tagen ausgesät (150.000 Zellen/Well), 2 Tage kultiviert und für 60 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten INS-1E-Zellen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

# zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

## zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

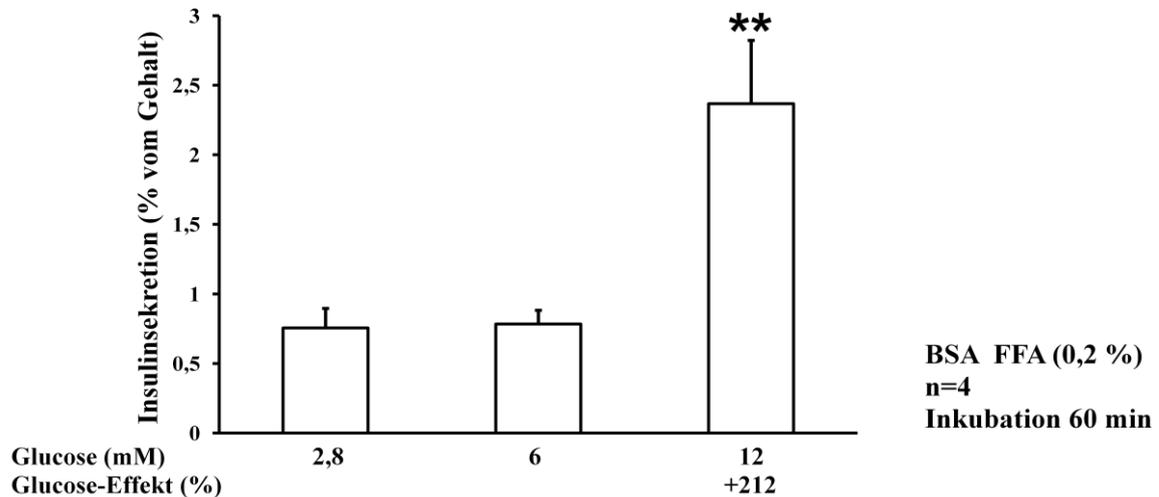
### 3.3 Effekte der Aktivierung von GPR40/FFAR1 auf die Insulinsekretion in isolierten Langerhans'schen Inselzellen der Maus

In diesen Versuchen wurde die Wirkung einer spezifischen Aktivierung von GPR40/FFAR1 in isolierten Langerhans'schen Inselzellen der Maus untersucht, da eine permanente Zelllinie nur bedingt die physiologischen Eigenschaften von insulinsezernierenden Betazellen widerspiegelt.

#### 3.3.1 GSIS in Langerhans'schen Inselzellen der Maus

Zunächst wurde der Einfluss von Glucose auf die Insulinsekretion untersucht (Abbildung 14). Mit einer zunehmenden Glucosekonzentration (2,8 bis 12 mM) stieg auch die GSIS an. Ein maximaler, hochsignifikanter Effekt konnte bei einer Konzentration von 12 mM mit einem beinahe dreifachen Anstieg gegenüber der basalen

Sekretion bei 2,8 mM beobachtet werden. 6 mM Glucose hatte keine signifikante stimulierende Wirkung auf die Insulinsekretion. Die Stimulation der Insulinsekretion durch Glucose ist vergleichbar mit dem Effekt von Glucose in INS-1E-Zellen.



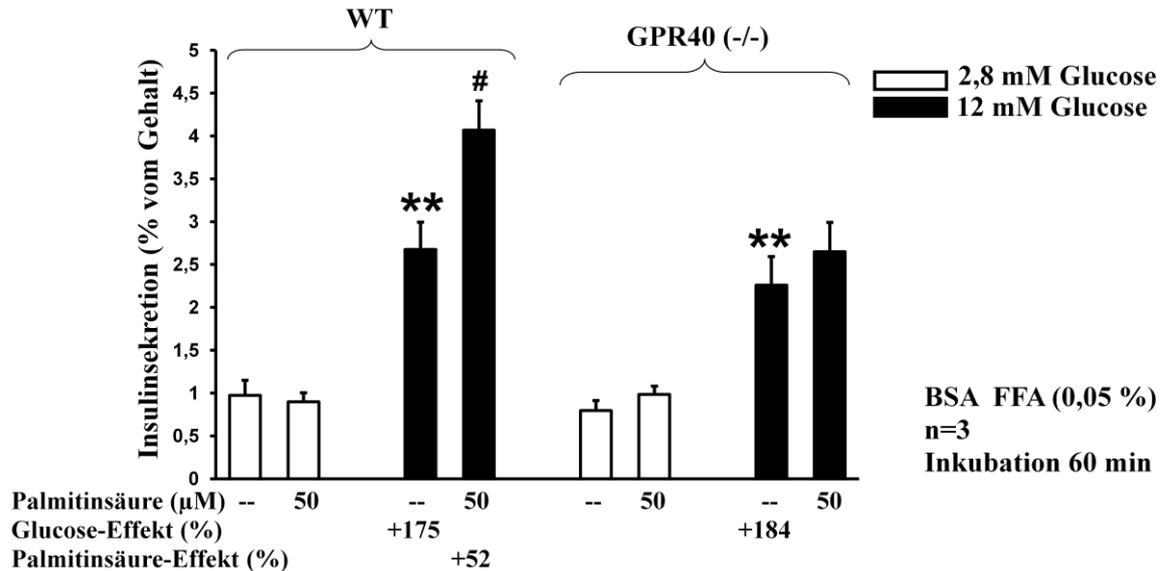
**Abbildung 14 Einfluss von Glucose auf die Insulinsekretion**

Die Insulinsekretion wurde von isolierten, über Nacht kultivierten und für 60 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten Langerhans-Inseln der Maus bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten. \*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

### 3.3.2 Einfluss von GPR40/FFAR1 auf die Insulinsekretion in Langerhans'schen Inselzellen der Maus

Mit Hilfe eines GPR40-Knockout-Mausmodells, welches keinen funktionellen GPR40/FFAR1 exprimiert, wurde untersucht, welche Effekte von Glucose, Palmitinsäure (Abbildung 15) und spezifischen Agonisten (Abbildung 16 und 17) über den Rezeptor vermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden Langerhans'sche Inselzellen aus Wildtyp- und GPR40-KO-Mäusen isoliert und deren Insulinsekretion parallel untersucht. Diese Versuche wurden alle bei einer BSA-Konzentration von 0,05 % durchgeführt. Dementsprechend wurde die Palmitinsäure-Konzentration angepasst. Die GSIS stieg sowohl in Wildtyp- als auch in Knockout-Mausinseln hochsignifikant um beinahe dem Dreifachen gegenüber der basalen Insulinfreisetzung an. Während Palmitinsäure in Wildtyp-Inseln zu einer signifikanten Verbesserung der GSIS beiträgt,

hatte es in Knockout-Inseln keinen Einfluss. Die Insulinsekretion in GPR40/FFAR1-defizienten Mausinseln ist also nicht mehr durch Palmitinsäure stimulierbar.



**Abbildung 15 GPR40/FFAR1-vermittelter Einfluss von Palmitinsäure auf die Insulinsekretion**

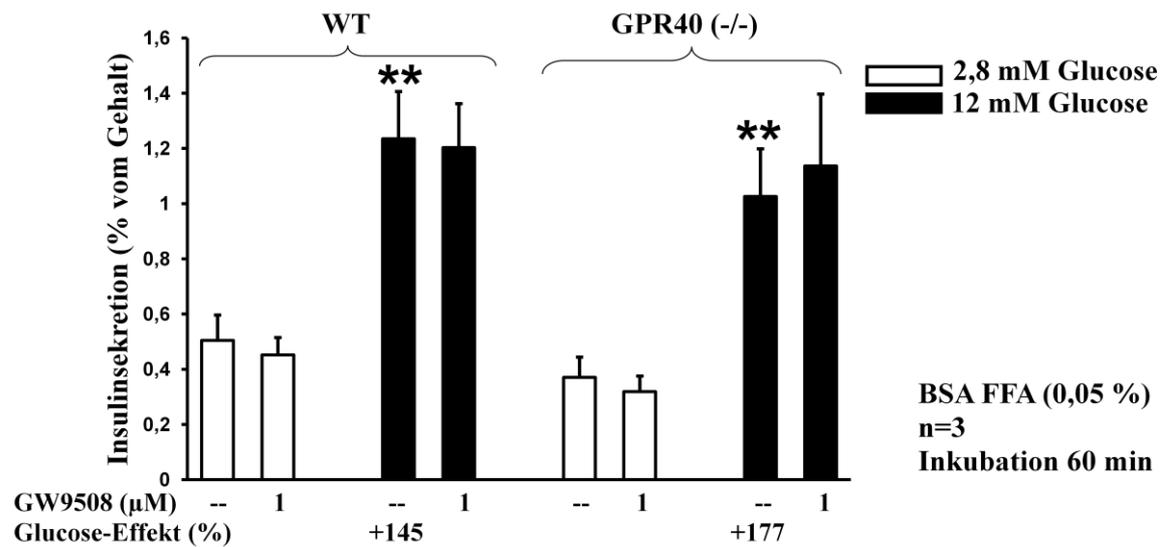
Die Insulinsekretion wurde von isolierten, über Nacht kultivierten und für 60 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten Langerhans-Inseln der Wildtyp- bzw. GPR40-Knockout-Maus bestimmt.

Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

# zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

GW9508 hatte weder in Wildtyp- noch in Knockout-Mausinseln einen Effekt auf die GSIS. Wahrscheinlich wurde die Substanz in einer zu niedrigen Konzentration eingesetzt und konnte nicht wirken, da sie nur unzureichend in die Inselkapsel eingedrungen war.



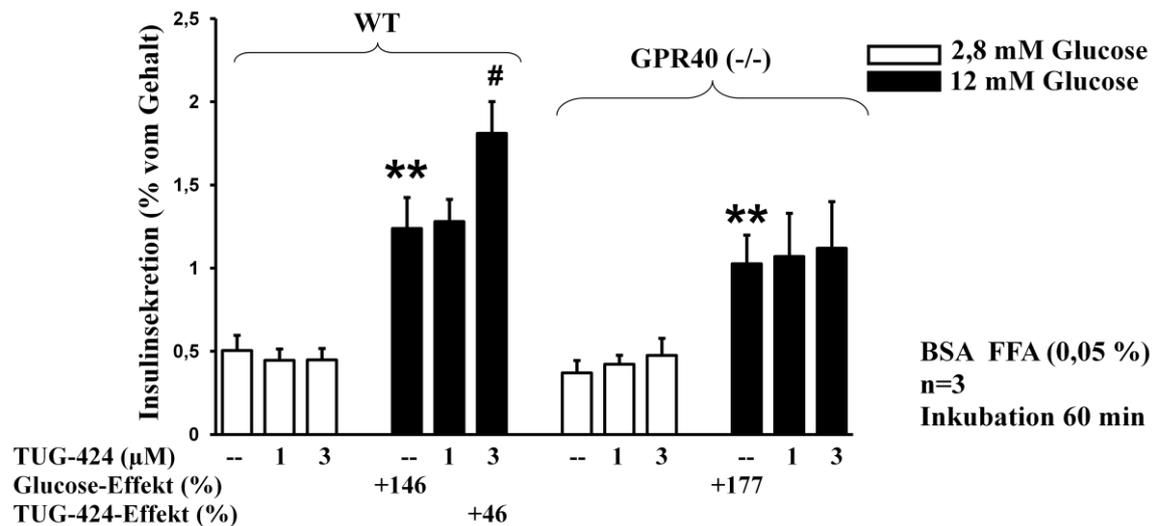
**Abbildung 16 GPR40/FFAR1-vermittelter Einfluss von GW9508 auf die Insulinsekretion**

Die Insulinsekretion wurde von isolierten, über Nacht kultivierten und für 60 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten Langerhans-Inseln der Wildtyp- bzw. GPR40-Knockout-Maus bestimmt.

Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

TUG-424 steigerte in der maximalen Konzentration von 3 μM die GSIS in Wildtyp-Mausinseln signifikant. Dagegen hatte es in Knockout-Inseln keinen Einfluss auf die Sekretion. Die Insulinsekretion in GPR40/FFAR1-defizienten Mausinseln ist also nicht mehr durch TUG-424 stimulierbar.



**Abbildung 17 GPR40/FFAR1-vermittelter Einfluss von TUG-424 auf die Insulinsekretion**

Die Insulinsekretion wurde von isolierten, über Nacht kultivierten und für 60 Minuten mit den angegebenen Testsubstanzen inkubierten Langerhans-Inseln der Wildtyp- bzw. GPR40-Knockout-Maus bestimmt.

Dargestellt ist der Mittelwert einschließlich Standardabweichung von mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

\*\* zeigt einen hochsignifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber der Kontrolle (2,8 mM Glucose) an.

# zeigt einen signifikanten Effekt auf die Stimulation der Insulinsekretion gegenüber Glucose 12 mM an.

Zusammenfassend lassen die Versuche den Schluss zu, dass Fettsäuren über die Aktivierung von GPR40/FFAR1 die Insulinsekretion fördern können. Dieser Weg kann spezifisch auch durch kleinmolekulare Stoffe genutzt werden. Wie anhand dieser Arbeit gezeigt werden konnte, scheinen sich die synthetisch hergestellten Substanzen GW9508 und TUG-424 als sekretionsfördernde Stimuli zu eignen, während die GPR40/FFAR1-Agonisten TUG-20, TUG-187 und TUG-221 weniger selektiv und daher ungeeignet zu sein scheinen. Der GPR40/FFAR1-Antagonist TUG-178 hatte ebenfalls keinen Effekt auf die GSIS.

## 4 Diskussion

Beim Diabetes mellitus handelt es sich um eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen denen ein Funktionsverlust von Insulin durch einen absoluten oder relativen Mangel gemeinsam ist. Das anabol wirksame Hormon wird bei einer erhöhten Glucosekonzentration im Blut sezerniert und induziert die Aufnahme von Glucose, Aminosäure und Fettsäure in die Leber, die Muskulatur und das Fettgewebe [16]. Bleibt dies aus, kommt es folglich zu einer Hyperglykämie im Blut. Dahingegen liegt der Glucosespiegel beim Gesunden unabhängig von Fasten- und Essensperioden konstant im Bereich von ca. 5 mmol/l (90 mg/dl) [17]. Die Regulation der Insulinsekretion aus den Betazellen des Pankreas ist ein komplexes Geschehen und wird durch Glucose, Fettsäuren, Aminosäuren, GLP-1, GIP, Somatostatin und Neurotransmitter beeinflusst. Dabei stellt Glucose den wichtigsten Stimulator dar [36]. FFA führen über Aktivierung des GPR40/FFAR1-Rezeptors zu einer Steigerung der GSIS [63; 126; 127]. Das Fehlen von GPR40/FFAR1 vermindert sowohl die Glucose-, als auch die FFA- und die Arginin-stimulierte Insulinsekretion ohne jedoch die Insulinsensitivität, die Genexpression oder den intrazellulären Stoffwechsel von Glucose und Palmitinsäure in den Betazellen zu beeinflussen [63; 124; 182; 183]. Ursache für eine verminderte Freisetzung von Insulin sowie die Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 1 oder Typ 2 kann auch die verstärkte Apoptose der Betazellen des Pankreas sein [188]. Im Falle des Typ 1 Diabetes mellitus sind bei Manifestation meist schon über 80 % der Betazellen durch Autoantikörper verloren gegangen [189]. Beim Diabetes mellitus Typ 2 geht durch die toxische Wirkung chronisch erhöhter Blutzuckerwerte bzw. einer Ansammlung von schädigenden Lipiden bis zu 50 % der Betazellmasse verloren [183; 186].

In dieser Studie wurde gezeigt, dass der GPR40/FFAR1-Rezeptor sowohl in Langerhans'schen Inseln der Maus als auch in INS-1E- und MIN6-Zelllinien exprimiert wird und die GSIS durch spezifische Aktivierung des Rezeptors beeinflusst werden kann. Dazu wurde der Effekt spezifischer, potentieller Agonisten und Antagonisten von GPR40/FFAR1 untersucht.

Die Aufnahme von Glucose in die Betazelle über das niedrigaffine Protein GLUT-2 erfolgt insulinunabhängig und zunehmend bei hohem Glucosespiegel [37; 38]. Auch der

Abbau in der Betazelle erfolgt im ersten Schritt durch ein Enzym mit niedriger Affinität für Glucose [39-41]. Dadurch steigt auch die GSIS erst ab einem Plasma-Glucose-Spiegel von ca. 5 mmol/l (90 mg/dl) signifikant an [41]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies bestätigt werden. Eine ansteigende Glucosekonzentration führte zu einer signifikanten Zunahme der Insulinausschüttung gegenüber der basalen Sekretion bei 2,8 mM Glucose sowohl in INS-1E-Zellen als auch in Langerhans'schen Inseln der Maus. Für einen signifikanten Anstieg der Sekretion war dabei jedoch sogar eine Glucosemenge > 6 mmol/l nötig. Dies weicht also von den Angaben in der Literatur ab, die besagen, dass im Menschen schon ab einer Konzentration von ca. 5 mmol/l eine deutliche Stimulation erfolgt. Ursächlich dafür könnte sein, dass die Messungen nicht an menschlichen, sondern an Ratteninsulinomzellen und isolierten Mausinseln durchgeführt wurden, die den humanen Betazellen ähnliche, jedoch nicht identische physiologische Eigenschaften besitzen. Eine ca. dreifache Steigerung der Insulinfreisetzung wurde bei einer Glucosemenge von 12 mM erreicht. Somit wurde die Sekretion bei 2,8 mM Glucose als basale, nicht-stimulierende Insulinfreisetzung festgesetzt und für alle folgenden Experimente als sogenannte Kontrollsekretion angenommen. Die Insulinfreisetzung bei 12 mM Glucose galt dagegen als sogenannte Vergleichssekretion, da hier die Insulinausschüttung hochsignifikant stimuliert war.

Um zu verhindern, dass das aus den INS-1E-Zellen bzw. Maus-Inseln freigesetzte Insulin degradiert oder unspezifisch an die Oberfläche der Reaktionsgefäße bindet, wurden alle Versuche mit BSA durchgeführt. Das routinemäßig verwendete BSA der Fraktion V stellt dabei eine fettsäurehaltige Substanz dar. Aus diesem Grund wurde für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente fettsäurefreies Albumin (BSA FFA) benutzt. Bei Vergleich der Insulinsekretion von INS-1E-Zellen in Anwesenheit von 0,2 % BSA V oder 0,2 % fettsäurefreiem BSA fiel auf, dass sowohl die basale als auch die Glucose-stimulierte Insulinsekretion in Anwesenheit von fettsäurefreier, BSA-haltiger Lösung signifikant geringer war. Jedoch war der Stimulationsindex von Glucose, der bei BSA V 0,35 sowie bei BSA FFA 0,33 betrug, nicht signifikant verändert. Ursache für die insgesamt stärkere Insulinfreisetzung könnten die im BSA V enthaltenen Fettsäuren und die Tatsache, dass GPR40/FFAR1 durch freie Fettsäuren stimuliert wird, sein. Dies lässt außerdem vermuten, dass im BSA V schon Bindungsstellen durch die enthaltenen Fettsäuren gesättigt sind und somit nach

Zugabe von Palmitin- bzw. Ölsäure die Konzentration an langkettigen, ungebundenen Fettsäuren und damit deren stimulierende Wirkung steigt. Dies erklärt die Beobachtung, dass fettsäurehaltiges BSA zwar den stimulierenden Effekt von Palmitinsäure und GW9508, nicht aber den von Glucose, verbessert. Die Änderung der basalen Insulinsekretion durch die benutzten BSA-Präparationen bleibt allerdings ungeklärt.

Nachdem sich die GPR40-/FFAR1-Agonisten als schlechte Stimulatoren der GSIS erwiesen haben, wurde getestet, ob eine Bindung der Substanzen an BSA für die schlechte sekretionssteigernde Wirkung verantwortlich ist. Tatsächlich verbessert die Reduktion der BSA-Konzentration auf 0,05 % die stimulierende Wirkung von GW9508 auf die Insulinsekretion. Eine BSA-Konzentration > 0,05% scheint sich dagegen hemmend auf die Stimulation von GPR40/FFAR1 auszuwirken. Dies lässt vermuten, dass die Bindung der lipophilen Agonisten an BSA deren Bindung an den Rezeptor vermindert bzw. gänzlich verhindert. Folglich müssen diese in ihrer Struktur so verändert werden, dass sie nach Verabreichung auch wirksam sein können. Dies ist bereits für den Agonisten TUG-469 gelungen. Durch Modifikation der Struktur konnte dessen Lipophilie reduziert und unter Beibehaltung der stimulierenden Potenz dessen metabolische Stabilität verbessert werden [184]. Die Potenz spezifischer GPR40/FFAR1-Agonisten auf die GSIS scheint also vom BSA beeinflusst zu werden. Folglich fand für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche BSA FFA 0,05 % Verwendung.

Freie Fettsäuren sind wichtig für die normale Funktion der Betazellen [185]. Sie steigern die Insulinfreisetzung entweder direkt durch Bindung an den GPR40/FFAR1-Rezeptor oder indirekt durch die Verstoffwechslung von im Zytoplasma akkumuliertem langkettigem Azyl-CoA [61]. Durch Aktivierung von GPR40/FFAR1 bewirken diese eine Zunahme der intrazellulären Calciumionen und eine verbesserte GSIS [186]. Der Anstieg der zytoplasmatischen Calciumionen erfolgt einerseits durch die Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanälen (VDCC) und andererseits durch die Aktivierung der Phospholipase C, welche IP3 und DAG bildet. IP3 stimuliert die Mobilisation von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol und DAG aktiviert die Proteinkinase C, welche selbst wiederum die Insulinsekretion beeinflusst [63; 64; 132; 133]. Außerdem stimuliert im Zytosol abgelagertes langkettiges Azyl-CoA entweder direkt die GSIS oder steigert diese über

Aktivierung der PKC [66; 67]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der beiden langkettigen Fettsäuren Palmitinsäure und Ölsäure auf die GSIS untersucht. Diese stellen physiologische Agonisten von GPR40/FFAR1 dar [62; 63; 125; 135; 137]. Palmitinsäure zeigte sowohl in der INS-1E-Zelllinie als auch in Langerhans'schen Inseln von Wildtyp-Mäusen einen insgesamt signifikanten stimulierenden Effekt auf die GSIS. Dabei hat es eine maximale Wirkung mit einer beinahe dreifachen Steigerung der Sekretion in INS-1E-Zellen bei einer Konzentration von 400  $\mu\text{M}$ . Bei dieser Konzentration bewirkt es außerdem auch eine signifikante Zunahme der basalen Insulinausschüttung. Dagegen hat die gesättigte Fettsäure keinen Einfluss auf die GSIS in GPR40/FFAR1-KO-Mäusen. Des Weiteren konnte die Wirkung von Palmitinsäure durch den GPR40/FFAR1-Antagonisten BYK743 signifikant gehemmt werden. Dies bestätigt die Erkenntnisse in der Literatur, dass Palmitinsäure einen Agonisten für GPR40/FFAR1 darstellt und deutet darauf hin, dass der Palmitinsäure-Effekt auf die GSIS spezifisch über diesen vermittelt wird. Auch Ölsäure stimuliert die GSIS in INS-1E-Zellen mit einem maximalen Effekt bei einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  und einem Anstieg der Insulinsekretion um das Doppelte. Dagegen konnte der Einfluss der einfach ungesättigten Fettsäure auf die basale Insulinsekretion nicht eindeutig eruiert werden. Während es unter vergleichbaren Bedingungen in einem Experiment keinen Effekt hatte, steigerte es diese in einem anderen Versuch. Ursächlich könnte die unterschiedlich eingesetzte Ausgangszellzahl und damit Kultivierungsdauer sein. INS-1E-Zellen, die mit 150.000 Zellen/Well ausgesät wurden, wurden vor der Inkubation mit den zu testenden Substanzen für 2 Tage kultiviert. Wurden dagegen nur 75.000 Zellen/Well verteilt, wurden diese für 3 Tage kultiviert, da in der Regel davon auszugehen ist, dass die Zellzahl exponentiell zunimmt. Da jedoch alle anderen Versuchsbedingungen zwischen diesen beiden Experimenten identisch waren, ist es dennoch denkbar, dass eine ungleiche Endzellzahl und somit ein differenter Gesamtinsulingehalt vorlag. Weiterhin ist es möglich, dass die Qualität der Zellen zwischen den einzelnen Versuchen inhomogen war. Zusammengefasst kann man dennoch sagen, dass Ölsäure die Insulinausschüttung glucose- und konzentrationsabhängig stimuliert.

Die synthetisch hergestellte Substanz GW9508 stellt einen wichtigen Liganden für GPR40/FFAR1 dar [138-140] und stimuliert die intrazelluläre Mobilisierung von

Calciumionen sowie die GSIS der Betazellen des Pankreas [138]. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Agonist die GSIS in INS-1E-Zellen durch Stimulation von GPR40/FFAR1 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M signifikant steigert. Durch den GPR40/FFAR1-Antagonisten BYK743 konnte die Wirkung von GW9508 signifikant gehemmt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung von GW9508 auf die GSIS tatsächlich über GPR40/FFAR1 vermittelt wird und bestätigt die Erkenntnisse in der Literatur. In den Langerhans'schen Inselzellen der Maus konnte kein Effekt von GW9508 nachgewiesen werden, da die Substanz wahrscheinlich in einer zu geringen Konzentration eingesetzt wurde und so nur unzureichend in die Inselkapsel eindringen konnte.

Die von Trond Ulven (Southern University von Dänemark) neu synthetisierten Substanzen TUG-20, -187, -221 und -178, deren Bindung an GPR40/FFAR1 bereits in einem Expressionssystem nachgewiesen wurde, zeigen unter den gewählten Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die GSIS. Die Agonisten TUG-187 und -221 führten sogar zu einer signifikanten Hemmung der basalen Insulinsekretion. Der selektive Antagonist TUG-178 hemmt über GPR40/FFAR1 die Zunahme der intrazellulären Calciumionen-Konzentration und damit die Insulinsekretion [138]. Im Rahmen dieser Arbeit verminderte TUG-178 jedoch nur die basale Insulinfreisetzung in INS-1E-Zellen signifikant. Der in der Literatur beschriebene hemmende Effekt auf die GSIS blieb dagegen aus. Die neuen synthetischen Substanzen scheinen also keinen selektiven Einfluss auf die Insulinsekretion über GPR40/FFAR1 zu haben. Da GPR40/FFAR1 nicht nur an Gq, sondern auch an Gi Proteine binden kann, ist es möglich, dass GPR40/FFAR1-Agonisten gleichzeitig sowohl sekretionsstimulierende Signalwege über Gq, als auch sekretionshemmende Signalwege über Gi aktivieren können. Eine derartige duale Wirkung könnte die schlechte stimulierende Wirkung der Agonisten sowie den schlechten hemmenden Effekt des Antagonisten auf die Sekretion erklären.

Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurde die Hemmung über Gi durch Vorbehandlung der INS-1E-Zellen mit Pertussistoxin unterbunden. Da in Zellen, die mit Pertussistoxin vorbehandelt wurden, Adrenalin die Insulinsekretion nicht mehr hemmen kann, wurde der Effekt des Toxins anhand der Wirkung von Adrenalin auf die Sekretion kontrolliert [107]. Es ist bereits bekannt, dass Adrenalin antagonistisch zu Insulin wirkt

und die Glucosekonzentration im Blut erhöhen kann [187]. Dabei führt es in pankreatischen Betazellen durch Aktivierung des Alpha 2 Adrenorezeptors zu einer Hemmung der Adenylatzyklase und der cAMP-Bildung [106]. Außerdem ist in diesem Zusammenhang eine Hyperpolarisation der Membran, eine Abnahme des Einstroms von Calciumionen und eine Aktivierung von GIRK-Kanälen in den Betazellen zu beobachten [108]. Adrenalin hemmte die GSIS sowohl mit als auch ohne Pertussistoxin-Vorbehandlung der INS-1E-Zellen signifikant. Nach Vorbehandlung mit Pertussistoxin war dieser Effekt jedoch signifikant geringer. Dies deutet darauf hin, dass Adrenalin die Insulinsekretion tatsächlich durch Aktivierung des inhibitorischen Gi-Proteins, welches wiederum durch Pertussistoxin ausgeschaltet werden kann, hemmt. Interessanterweise hatte Pertussistoxin keinen signifikanten Einfluss auf den Effekt von Ölsäure. Dies lässt vermuten, dass die Fettsäure nicht zu einer simultanen Aktivierung von Gq und Gi führt, sondern über GPR40/FFAR1 nur das stimulierende Gq-Protein aktiviert.

Im Gegensatz zu den bis dahin getesteten Substanzen zeigte ein weiterer Agonist (TUG-424) eine stimulierende Wirkung auf die GSIS. TUG-424 stimulierte die Insulinsekretion glucose- und konzentrationsabhängig sowohl in INS-1E-Zellen als auch in Langerhans'schen Inseln von Wildtyp-Mäusen. Eine maximale Verbesserung der GSIS auf nahezu das Doppelte konnte bei einer Konzentration des Agonisten von 3  $\mu$ M gemessen werden. Dies ist vergleichbar mit dem maximalen Effekt von Palmitinsäure. Da TUG-424 in Langerhans'schen Inseln von GPR40/FFAR1-Knockout-Mäusen keine Wirkung auf die GSIS hatte, wurde der stimulierende Effekt des Agonisten von GPR40/FFAR1 vermittelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fettsäuren Ölsäure und Palmitinsäure sowie die synthetisch hergestellten, kleinmolekularen Substanzen GW9508 und TUG-424 die Insulinsekretion über Aktivierung von GPR40/FFAR1 spezifisch stimulieren und sich somit als sekretionsfördernde Stimuli zu eignen scheinen. Die Wirksamkeit auf die Insulinfreisetzung ist dabei BSA-, glucose- und konzentrationsabhängig. Eine maximale Stimulation konnte in Anwesenheit von 12 mM Glucose erzielt werden. Die anderen getesteten Substanzen TUG-20, TUG-187, TUG-221 und TUG-178 sind dagegen weniger selektiv und daher zur Steigerung der GSIS eher ungeeignet. Der GPR40/FFAR1-Rezeptor könnte somit einen potentiellen pharmakologischen

Angriffspunkt zur Verbesserung der Betazellfunktion und Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 darstellen. Des Weiteren stellen GW9508 und TUG-424 potentielle pharmakologische Substanzen in der Therapie des Diabetes mellitus dar. Der selektive GPR40/FFRA1-Agonist TAK-785, der die GSIS ebenfalls stimuliert und dabei nur ein geringes Hypoglykämierisiko hat, stellt ebenfalls eine potentielle therapeutische Substanz zur Regulation des Plasma-Glucosespiegels dar und befindet sich bereits in Phase I der Arzneimittelzulassung [190-192].

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung einer spezifischen Stimulation des GPR40/FFAR1-Rezeptors auf insulinsezernierende Betazellen des Pankreas untersucht. Zunächst wurde die Expression von GPR40/FFAR1 in INS-1E- und MIN6-Zellen sowie in Langerhans'schen Inselzellen der Maus mittels PCR nachgewiesen. Anschließend wurde der Effekt potentieller GPR40/FFAR1-Agonisten und Antagonisten auf die GSIS durch Inkubation von INS-1E-Zellen sowie von Mausinseln mit den jeweiligen, zu testenden Substanzen, untersucht.

Eine zunehmende Glucosekonzentration bewirkte einen signifikanten Anstieg der Insulinsekretion sowohl in INS-1E-Zellen als auch in Langerhans'schen Inseln der Maus.

Die beiden Fettsäuren Ölsäure und Palmitinsäure sowie die synthetisch hergestellten, kleinmolekularen Substanzen GW9508 und TUG-424 können die Insulinsekretion über Aktivierung von GPR40/FFAR1 spezifisch stimulieren und scheinen sich somit als sekretionsfördernde Stimuli zu eignen. Der Effekt auf die Insulinsekretion ist dabei BSA-, glucose- und konzentrationsabhängig. Die stärkste Stimulation konnte in Anwesenheit von 12 mM Glucose erzielt werden. Weiterhin erwies sich eine BSA-Konzentration von 0,05 % als optimale Bedingung.

Der Agonist GW9508 zeigte den stärksten stimulierenden Effekt auf die GSIS bei einer BSA-Konzentration von 0,05 %. BSA-Konzentration  $\geq 0,1$  % wirkten sich dagegen hemmend aus. Es ist anzunehmen, dass die Bindung des Agonisten an BSA dessen Bindung an GPR40/FFAR1 teilweise bzw. vollständig verhindert. Folglich ist eine Modifikation der Struktur lipophiler Agonisten nötig, damit diese nach ihrer Verabreichung auch wirken können. Dies ist bereits für TUG-469 gelungen, dessen Lipophilie reduziert und metabolische Stabilität unter Erhalt der stimulierenden Wirkung verbessert werden konnte [184].

Des Weiteren war in Anwesenheit von fettsäurehaltigem BSA V die stimulierende Wirkung von GW9508 und Palmitinsäure auf die GSIS im Vergleich zu BSA FFA signifikant verbessert. Ursächlich könnten die im BSA V enthaltenen Fettsäuren sein. Dabei ist es denkbar, dass diese die freien Bindungsstellen von Albumin bereits sättigen und somit die freie Konzentration an den zu testenden Substanzen und damit deren

stimulierende Wirkung steigt.

Die synthetisch hergestellten Agonisten TUG-20, TUG-187 und TUG-221 zeigten keine signifikanten Effekte auf die GSIS. Ursache für die schlechte stimulierende Wirkung der Substanzen auf die Insulinsekretion könnte eine simultane Aktivierung sekretionsstimulierender Signalwege über Gq als auch sekretionshemmender Signalwege über Gi sein. Diese scheinen somit weniger selektiv und daher ungeeignet zur Stimulation der GSIS zu sein. Der GPR40/FFAR1-Antagonist TUG-178 zeigte ebenfalls keine Wirkung auf die GSIS.

Besonders GW9508 und TUG-424 stellen potentielle pharmakologische Substanzen in der Therapie des Diabetes mellitus dar. Außerdem könnte der GPR40/FFAR1-Rezeptor einen potentiellen pharmakologischen Angriffspunkt zur Verbesserung der Betazellfunktion und Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 darstellen.

## 6 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	Nachweis von GPR40/FFAR1 .....	41
Abbildung 2	Einfluss von Palmitinsäure und Ölsäure auf die Insulinsekretion .....	43
Abbildung 3	Einfluss von Palmitinsäure und Ölsäure auf die Insulinsekretion .....	44
Abbildung 4	Einfluss von Palmitinsäure, GW9508 und BYK734 auf die Insulinsekretion .....	45
Abbildung 5	Einfluss von GW9508 und BYK743 auf die Insulinsekretion.....	46
Abbildung 6	Effekt von BSA V und BSA FAF auf den Einfluss von Palmitinsäure und GW9508 auf die Insulinsekretion. ....	47
Abbildung 7	Einfluss von neuen spezifischen GPR40/FFAR1-Agonisten und -Antagonisten auf die Insulinsekretion.....	49
Abbildung 8	Einfluss von neuen spezifischen GPR40/FFAR1-Agonisten und -Antagonisten auf die Insulinsekretion.....	50
Abbildung 9	Effekt verschiedener BSA-Konzentrationen auf den Einfluss von GW9508 auf die Insulinsekretion .....	51
Abbildung 10	Effekt des Fehlens von BSA auf den Einfluss von GW9508 auf die Insulinsekretion .....	52
Abbildung 11	Effekt von Pertussistoxin auf den Einfluss von Ölsäure und Adrenalin auf die Insulinsekretion. ....	54
Abbildung 12	Einfluss von TUG-424 auf die Insulinsekretion .....	55
Abbildung 13	Einfluss von TUG-424 auf die Insulinsekretion .....	56
Abbildung 14	Einfluss von Glucose auf die Insulinsekretion.....	57
Abbildung 15	GPR40/FFAR1-vermittelter Einfluss von Palmitinsäure auf die Insulinsekretion .....	58
Abbildung 16	GPR40/FFAR1-vermittelter Einfluss von GW9508 auf die Insulinsekretion .....	59
Abbildung 17	GPR40/FFAR1-vermittelter Einfluss von TUG-424 auf die Insulinsekretion .....	60

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Mausmodelle und Zelllinien .....	21
Tabelle 2	Verwendete Enzyme und zugehörige Puffer.....	21
Tabelle 3	Verwendete DNA-Standards.....	21
Tabelle 4	Verwendete Kits.....	21
Tabelle 5	Verwendete Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese .....	22
Tabelle 6	Verwendete GPR40-Rezeptor-Liganden.....	22
Tabelle 7	Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	23
Tabelle 8	Verwendete Geräte und Hilfsmittel .....	24
Tabelle 9	Verwendete Verbrauchsmittel.....	24
Tabelle 10	Ansatz zur Herstellung des Kulturmediums für die INS-1E-Zellen .....	26
Tabelle 11	Ansatz zur Herstellung von vierfach konzentrierter Hanks-Lösung.....	26
Tabelle 12	Ansatz zur Herstellung der Kollagenase-Lösung zum Verdau des exokrinen Pankreas (ohne BSA) .....	27
Tabelle 13	Ansatz zur Herstellung des Kulturmediums für die Inseln .....	29
Tabelle 14	Ansatz des Mastermixes zur Herstellung von cDNA aus RNA.....	31
Tabelle 15	Sequenzen und Eigenschaften der Primer zur Amplifizierung von GPR40/FFAR1 .....	32
Tabelle 16	PCR-Ansatz zum Nachweis von GPR40 .....	33
Tabelle 17	PCR-Programm zum Nachweis von GPR40/FFAR1 .....	33
Tabelle 18	Ansatz zur Herstellung der KRB-Lösung zur Inkubation von INS-1E-Zellen.....	34
Tabelle 19	Verwendete Testsubstanzen .....	35
Tabelle 20	Beispielhafter Ansatz zur Inkubation der INS-1E-Zellen mit den Testsubstanzen .....	35
Tabelle 21	Ansatz zur Herstellung von saurem Ethanol.....	36
Tabelle 22	Ansatz zur Herstellung der KRB-Lösung zur Inkubation der INS-1E-Zellen.....	36
Tabelle 23	Verwendete Testsubstanzen .....	37
Tabelle 24	Beispielhafter Ansatz zur Inkubation der Mausinseln mit den Testsubstanzen .....	37

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Schneider T. Diabetes through the ages: a salute to insulin. *S Afr Med J* (1972) 46: 1394-1400.
- [2] Sir GA. Lessons from the history of insulin. *Diabetes Voice* (2001) 46: 33-34.
- [3] Goldfine ID and Youngren JF. Contributions of the American Journal of Physiology to the discovery of insulin. *Am J Physiol* (1998) 274: 207-209.
- [4] Franke H and Fuchs J. A new anti-diabetes principle: Results of clinical research. *Dtsch Med Wochenschr* (1955) 80: 1449-1452.
- [5] Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* (1997) 20: 1183-1197.
- [6] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* (1998) 15: 539-553.
- [7] Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino Y, Ito C, Shima K, Nonaka K, Kadowaki T. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* (2002) 55: 65-85.
- [8] Gorsuch AN, Dean BM, Bottazzo GF, Lister J, Cudworth AG. Evidence that type I diabetes and thyrogastric autoimmunity have different genetic determinants. *Br Med J* (1980) 280: 145-147.
- [9] Hauner H. Verbreitung des Diabetes mellitus in Deutschland. *Dtsch Med Wochenschr* (1998) 123: 777-782.
- [10] Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR. Metabolic syndrome: Evaluation of pathological and therapeutic outcomes. *Am Heart J* (2005) 149: 20-32.
- [11] Müller-Wieland D, Häring HU (2001). *Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien*. 1: 223-257. Ganten D, Ruckpaul K, Janssen OE, Heufelder AE. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [12] Haupt A, Staiger H, Schäfer SA, Kirchoff K, Guthoff M, Machicao F, Gallwitz B, Stefan N, Häring HU, Fritsche A. The risk allele load accelerates the agedependent decline in beta cell function. *Diabetologia* (2009) 52: 457-462.
- [13] King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025:

- prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* (1998) 21: 1414-1431
- [14] Gu K, Cowie CC, Harris MI. Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971-1993. *Diabetes Care* (1998) 21: 1138-1145.
- [15] Schatz H. Biosynthese von Insulin. *Dtsch Med Wochenschr* (1977) 102: 734-740.
- [16] Saltiel AR and Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* (2001) 414: 799-806.
- [17] Duckworth WC, Bennett RG and Hamel FG. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* (1998) 19: 608-624.
- [18] Dong X, Park S, Lin X, Copps K, Yi X, White MF. Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. *J Clin Invest* (2006) 116: 101-114.
- [19] Lingohr MK, Briaud I, Dickson LM, McCuaig JF, Alarcon C, Wicksteed BL, Rhodes CJ. Specific regulation of IRS-2 expression by glucose in rat primary pancreatic islet beta -cells. *J Biol Chem* (2006) 281:15884-15892.
- [20] Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM., Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* (1998) 391: 900-904.
- [21] Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2000) 278: 127-133.
- [22] Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn CR. Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol* (2001) 21: 26-38.
- [23] Lingohr MK, Dickson LM, Wrede CE, McCuaig JF, Myers MG Jr, Rhodes CJ. IRS-3 inhibits IRS-2-mediated signaling in pancreatic beta-cells. *Mol Cell Endocrinol* (2003) 204: 85-99.
- [24] Dickson LM and Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2004) 287: 192-198.
- [25] Alessi DR and Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* (1998) 8: 55-62.

- [26] Meda P. Cx36 involvement in insulin secretion: characteristics and mechanism. *Cell Commun Adhes* (2003) 10: 431-435.
- [27] Michon L, Nlend R, Bavamian S, Bischoff L, Boucard N, Caille D, Cancela J, Charollais A, Charpantier E, Klee P, Peyrou M, Populaire C, Zulianello L, Meda P. Involvement of gap junctional communication in secretion. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1719: 82-101.
- [28] Serre-Beinier V, Bosco D, Zulianello L, Charollais A, Caille D, Charpantier E, Gauthier BR, Diaferia GR, Giepmans BN, Lupi R, Marchetti P, Deng S, Buhler L, Berney T, Cirulli V, Meda P. Cx36 makes channels coupling human pancreatic beta-cells, and correlates with insulin expression. *Hum Mol Genet* (2009) 18: 428-439.
- [29] Ballian N and Brunnicardi FC. Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. *World J Surg* (2007) 31: 705-714.
- [30] Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion - implications for health and disease. *Diabetologia* (2000) 43: 393-410.
- [31] Bonner-Weir S. Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* (2000) 11: 375-378.
- [32] Lingohr MK, Buettner R, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival-a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends Mol Med* (2002) 8: 375-384.
- [33] Hugl SR and Merger M. Prolactin stimulates proliferation of the glucosedependent beta-cell line INS-1 via different IRS-proteins. *JOP* (2007) 8: 739-752.
- [34] Bouwens L and Rooman I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev* (2005) 85: 1255-1270.
- [35] Clark A and Nilsson MR. Islet amyloid: a complication of islet dysfunction or an aetiological factor in type 2 diabetes? *Diabetologia* (2004) 47: 157-169.
- [36] Malaisse WJ. Insulin secretion: Multifactorial regulation for a single process of release. *Diabetologia* (1973) 9: 167-173.
- [37] Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and  $\beta$ -pancreatic islet cells. *Cell* (1988) 55: 281-290.
- [38] Thorens B, Deriaz N, Bosco D, DeVos A, Pipeleers D, Schuit F, Meda P and Porret A. Protein kinase A-dependent phosphorylation of GLUT2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* (1996) 271: 8075-8081.
- [39] Tiedge M, Steffek H, Elsner M and Lenzen S. Metabolic regulation, activity

- state, and intracellular binding of glucokinase in insulin-secreting cells. *Diabetes* (1999) 48: 514-523.
- [40] Schuit FC, Huypens P, Heimberg H and Pipeleers DG. Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* (2001) 50: 1-11.
- [41] Matschinsky FM. Banting Lecture 1995: A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* (1996) 45: 223-241.
- [42] Curi R, Williams JF, Newsholme EA. Pyruvate metabolism by lymphocytes: Evidence for an additional ketogenic tissue. *Biochem Int* (1989) 19: 755-767.
- [43] Prentki M, Corkey BE. Are the  $\beta$ -cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* (1996) 45: 273-283.
- [44] Rorsman P and Renstrom E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* (2003) 46: 1029-1045.
- [45] Gilon P, Ravier MA, Jonas JC and Henquin JC. Control mechanisms of the oscillations of insulin secretion in vitro and in vivo. *Diabetes* (2002) 51: 144-151.
- [46] Vallar L, Biden TJ, Wollheim CB. Guanine nucleotides induce  $Ca^{2+}$ -independent insulin secretion from permeabilized RINm5F cells. *J Biol Chem* (1987) 262: 5049-5056.
- [47] Regazzi R, Li G, Ullrich S, Jaggi C, Wollheim CB. Different requirements for protein kinase C activation and  $Ca^{2+}$ -independent insulin secretion in response to guanine nucleotides. Endogenously generated diacylglycerol requires elevated  $Ca^{2+}$  for kinase C insertion into membranes. *J Biol Chem* (1989) 264: 9939-9944.
- [48] Kibbey RG, Pongratz RL, Romanelli AJ, Wollheim CB, Cline GW, Shulman GI. Mitochondrial GTP regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metab* (2007) 5: 253-264.
- [49] Prentki M, Vischer S, Glennon MC, Regazzi R, Deeney JT, Corkey BE. Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem* (1992) 267: 5802-5810.
- [50] Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial signals in glucose-stimulated insulin secretion in the beta cell. *J Physiol* (2000) 529: 49-56.
- [51] Maechler P, Antinozzi PA, Wollheim CB. Modulation of glutamate generation in mitochondria affects hormone secretion in INS-1E beta cells. *IUBMB. Life*

- (2000) 50: 27-31.
- [52] Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* (2001) 414: 807-812.
- [53] MacDonald MJ. Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J Biol Chem* (1995) 270: 20051-20058.
- [54] Schrey MP, Montague W. Phosphatidylinositol hydrolysis in isolated guinea-pig islets of Langerhans. *Biochem J* (1983) 216: 433-441.
- [55] Best L, Dunlop M, Malaisse WJ. Phospholipid metabolism in pancreatic islets. *Experientia* (1984) 40: 1085-1091.
- [56] Jones PM, Persaud SJ, Howell SL. Insulin secretion and protein phosphorylation in PKC-depleted islets of Langerhans. *Life Sci* (1992) 50: 761-767.
- [57] Jones PM, Persaud SJ. Arachidonic acid as a second messenger in glucose-induced insulin secretion from pancreatic beta-cells. *J Endocrinol* (1993) 137: 7-14.
- [58] Metz SA. Membrane phospholipid turnover as an intermediary step in insulin secretion. Putative roles of phospholipases in cell signaling. *Am J Med* (1988) 85: 9-21.
- [59] Persaud SJ, Roderigo-Milne HM, Squires PE, Sugden D, Wheeler-Jones CP, Marsh PJ, Belin VD, Luther MJ, Jones PM. A key role for  $\beta$ -cell cytosolic phospholipase A2 in the maintenance of insulin stores but not in the initiation of insulin secretion. *Diabetes* (2001) 51: 98-104.
- [60] Metz SA. Exogenous arachidonic acid promotes insulin release from intact or permeabilized rat islets by dual mechanisms. Putative activation of  $Ca^{2+}$  mobilization and protein kinase C. *Diabetes* (1988) 37: 1453-1469.
- [61] Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* (2006) 55: 16-23.
- [62] Fujiwara K, Maekawa F, Yada T. Oleic acid interacts with GPR40 to induce  $Ca^{2+}$  signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type  $Ca^{2+}$  channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2005) 289: 670-677.
- [63] Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* (2003) 422: 173-176.

- [64] Alcazar O, Qiu-yue Z, Gine E, Tamarit-Rodriguez J. Stimulation of islet protein kinase C translocation by palmitate requires metabolism of the fatty acid. *Diabetes* (1997) 46: 1153-1158.
- [65] McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* (1990) 70: 391-425.
- [66] Deeney JT, Gromada J, Hoy M, Olsen HL, Rhodes CJ, Prentki M, Berggren PO, Corkey BE. Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells). *J Biol Chem* (2000) 275: 9363-9368.
- [67] Yaney GC, Korchak HM, Corkey BE. Long-chain acyl CoA regulation of protein kinase C and fatty acid potentiation of glucose-stimulated insulin secretion in clonal beta-cells. *Endocrinol* (2000) 141: 1989-1998.
- [68] Preitner F, Ibberson M, Franklin I, Binnert C, Pende M, Gjinovci A, Hansotia T, Drucker DJ, Wollheim C, Burcelin R, Thorens B. Gluco-incretins control insulin secretion at multiple levels as revealed in mice lacking GLP-1 and GIP receptors. *J Clin Invest* (2004) 113: 635-645.
- [69] Ebert R, Unger H, Creutzfeldt W. Preservation of incretin activity after removal of gastric inhibitory polypeptide (GIP) from rat gut extracts by immunoadsorption. *Diabetologia* (1983) 24: 449-454.
- [70] Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, Salaun-Martin C. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab* (2005) 31: 233-242.
- [71] Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinol* (1995) 136: 3585-3596.
- [72] Ding WG and Gromada J. Protein kinase A-dependent stimulation of exocytosis in mouse pancreatic beta-cells by glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *Diabetes* (1997) 46: 615-621.
- [73] Trumper A, Trumper K, Trusheim H, Arnold R, Goke B, Horsch D. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Mol Endocrinol* (2001) 15: 1559-1570.
- [74] Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y, Seino S. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* (2000) 2: 805-811.
- [75] Lu M, Wheeler MB, Leng XH, Boyd AE III. The role of the free cytosolic calcium level in beta-cell signal transduction by gastric inhibitory polypeptide

- and glucagon-like peptide I(7-37). *Endocrinol* (1993) 132: 94-100.
- [76] Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) 84: 3434-3438.
- [77] Light PE, Manning FoxJE, Riedel MJ, Wheeler MB. Glucagon-like peptide-1 inhibits pancreatic ATP-sensitive potassium channels via a protein kinase A- and ADP-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* (2002) 16: 2135-2144.
- [78] Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Holst JJ, Nielsen JH, Rorsman P. Glucagon-like peptide 1(7-36) amide stimulates exocytosis in human pancreatic  $\beta$ -cells by both proximal and distal regulatory steps in stimulus-secretion coupling. *Diabetes* (1998) 47: 57-65.
- [79] Holz GG, Leech CA, Heller RS, Castonguay M., Habener JF. cAMP-dependent mobilization of intracellular  $Ca^{2+}$  stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic beta-cells. A  $Ca^{2+}$  signaling system stimulated by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37). *J Biol Chem* (1999) 274: 14147-14156.
- [80] MacDonald PE, Wang X, Xia F, El Kholy W, Targonsky ED, Tsushima RG, Wheeler MB. Antagonism of rat beta-cell voltage-dependent  $K^+$  currents by exendin 4 requires dual activation of the cAMP/protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *J Biol Chem* (2003) 278: 52446-52453.
- [81] Fehmman HC and Habener JF. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I (7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinol* (1992) 130: 159-166.
- [82] Jhala US, Canettieri G, Sreaton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White M, Montminy M. cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev* (2003) 17: 1575-1580.
- [83] Buteau J, Spatz ML, Accili D. Transcription factor FoxO1 mediates glucagon-like peptide-1 effects on pancreatic beta-cell mass. *Diabetes* (2006) 55: 1190-1196.
- [84] Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* (2000) 49: 741-748.
- [85] Wang X, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 causes pancreatic duodenal homeobox-1 protein translocation from the cytoplasm to the nucleus of pancreatic beta-cells by a cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A-dependent mechanism. *Endocrinol* (2001) 142: 1820-1827.

- [86] Buteau J, Foisy S, Joly E, Prentki M. Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes* (2003) 52: 124-132.
- [87] Kashima Y, Miki T, Shibasaki T, Ozaki N, Miyazaki M, Yano H, Seino S. Critical role of cAMP-GEFII-Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J Biol Chem* (2001) 276: 46046-46053.
- [88] Kang G, Chepurny OG, Rindler MJ, Collis L, Chepurny Z, Li WH, Harbeck M, Roe MW, Holz GG. A cAMP and Ca<sup>2+</sup> coincidence detector in support of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in mouse pancreatic beta cells. *J Physiol* (2005) 566: 173-188.
- [89] Kang G, Chepurny OG, Malester B, Rindler MJ, Rehmann H, Bos JL, Schwede F, Coetzee WA, Holz GG. cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic beta cells and rat INS-1 cells. *J Physiol* (2006) 573: 595-609.
- [90] Holst JJ and Orskov C. The incretin approach for diabetes treatment: modulation of islet hormone release by GLP-1 agonism. *Diabetes* (2004) 53: 197-204.
- [91] Gallwitz B. Exenatide in type 2 diabetes: treatment effects in clinical studies and animal study data. *Int J Clin Pract* (2006) 60: 1654-1661.
- [92] Gallwitz B. New therapeutic strategies for the treatment of type 2 diabetes mellitus based on incretins. *Rev Diabet Stud* (2005) 2: 61-69.
- [93] Gilon P and Henquin JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* (2001) 22: 565-604.
- [94] Kurose T, Seino Y, Nishi S, Tsuji K, Taminato T, Tsuda K, Imura H. Mechanism of sympathetic neural regulation of insulin, somatostatin, and glucagon secretion. *Am J Physiol* (1990) 258: 220-227.
- [95] Boschero AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM, Bordin S, Paul I, Rojas E, Atwater I. Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol* (1995) 268: 336-342.
- [96] Niwa T, Matsukawa Y, Senda T, Nimura Y, Hidaka H, Niki I. Acetylcholine activates intracellular movement of insulin granules in pancreatic beta-cells via inositol trisphosphate-dependent [correction of triphosphate-dependent] mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Diabetes* (1998) 47: 1699-1706.
- [97] Persaud SJ, Jones PM, Howell SL. Activation of protein kinase C is essential for sustained insulin secretion in response to cholinergic stimulation. *Biochim Biophys Acta* (1991) 1091: 120-122.

- [98] Konrad RJ, Jolly YC, Major C, Wolf BA. Carbachol stimulation of phospholipase A2 and insulin secretion in pancreatic islets. *Biochem J* (1992) 287: 283-290.
- [99] Gagerman E, Sehlin J, and Taljedal IB. Effects of acetylcholine on ion fluxes and chlorotetracycline fluorescence in pancreatic islets. *J Physiol* (1980) 300: 505-513.
- [100] Gilon P, Nenquin M, and Henquin JC. Muscarinic stimulation exerts both stimulatory and inhibitory effects on the concentration of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  in the electrically excitable pancreatic  $\beta$ -cell. *Biochem J* (1995) 311: 259-267.
- [101] Henquin JC, Garcia MC, Bozem M, Hermans MP, and Nenquin M. Muscarinic control of pancreatic B cell function involves sodium-dependent depolarization and calcium influx. *Endocrinology* (1988) 122: 2134-2142.
- [102] Yada T, Hamakawa N, and Yaekura K. Two distinct modes of  $Ca^{2+}$  signalling by ACh in rat pancreatic beta-cells: concentration, glucose dependence and  $Ca^{2+}$  origin. *J Physiol* (1995) 488: 13-24.
- [103] Straub SG and Sharp GW. A wortmannin-sensitive signal transduction pathway is involved in the stimulation of insulin release by vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J Biol Chem* (1996) 271: 1660-1668.
- [104] Gregersen S and Ahrén B. Studies on the mechanisms by which gastrin releasing peptide potentiates glucose-induced insulin secretion from mouse islets. *Pancreas* (1996) 12: 48-57.
- [105] Lacey RJ, Chan SL, Cable HC, James RF, Perrett CW, Scarpello JH, Morgan NG. Expression of alpha 2- and beta-adrenoceptor subtypes in human islets of Langerhans. *J Endocrinol* (1996) 148: 531-543.
- [106] Peterhoff M, Sieg A, Brede M, Chao CM, Hein L, Ullrich S. Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in alpha2-adrenoceptor knockout mice. *Eur J Endocrinol* (2003) 149: 343-350.
- [107] Ullrich S and Wollheim CB. Islet cyclic AMP levels are not lowered during alpha 2-adrenergic inhibition of insulin release. *J Biol Chem* (1984) 259: 4111-4115.
- [108] Rorsman P, Bokvist K, Ämmälä C, Arkhammar P, Berggren PO, Larsson O, Wahlander K. Activation by adrenaline of a low-conductance G protein-dependent  $K^+$  channel in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* (1991) 349: 77-79.
- [109] Morgan DG, Kulkarni RN, Hurley JD, Wang ZL, Wang RM, Ghatei MA, Karlsen AE, Bloom SR, Smith DM. Inhibition of glucose stimulated insulin

- secretion by neuropeptide Y is mediated via the Y1 receptor and inhibition of adenylyl cyclase in RIN 5AH rat insulinoma cells. *Diabetologia* (1998) 41: 1482-1491.
- [110] Ullrich S and Wollheim CB. Galanin inhibits insulin secretion by direct interference with exocytosis. *FEBS Lett* (1989) 247: 401-404.
- [111] Brunicardi FC, Shavelle DM, Andersen DK. Neural regulation of the endocrine pancreas. *Int J Pancreatol* (1995) 18: 177-195.
- [112] Hirasawa A, Hara T, Katsuma S, Adachi T, Tsujimoto G. Free fatty acid receptors and drug discovery. *Biol Pharm Bull* (2008) 31: 1847-1851.
- [113] Bernard J. Free fatty acid receptor family: novel targets for the treatment of diabetes and dyslipidemia. *Curr Opin Investig Drugs*. (2008) 9: 1078-83.
- [114] Telvekar VN, Kundaikar HS. GPR40 carboxylic acid receptor family and diabetes: a new drug target. *Curr Drug Targets*. (2008) 9: 899-910.
- [115] Costanzi S, Neumann S, Gershengorn MC. Seven transmembrane-spanning receptors for free fatty acids as therapeutic targets for diabetes mellitus: pharmacological, phylogenetic, and drug discovery aspects. *J Biol Chem*. (2008) 283: 16269-16273.
- [116] Winzell MS, Ahren B. G-protein-coupled receptors and islet function-implications for treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol Ther* (2007) 116: 437-448.
- [117] Rayasam GV, Tulasi VK, Davis JA, Bansal VS. Fatty acid receptors as new therapeutic targets for diabetes. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 11: 661-671.
- [118] Sawzdargo M, George SR, Nguyen T, Xu SJ, Kolakowski LF, Odowd BF. A cluster of four novel human G-protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to cd22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem Biophys Res Commun* (1997) 239: 543-547.
- [119] Brown AJ, Jupe S, Briscoe CP. A family of fatty acid binding receptors. *DNA Cell Biol* (2005) 24: 54-61.
- [120] Tikhonova IG, Sum CS, Neumann S, Thomas CJ, Raaka BM, Costanzi S, Gershengorn MC. Bidirectional, iterative approach to the structural delineation of the functional "chemoprint" in GPR40 for agonist recognition. *J Med Chem* (2007) 50: 2981-2989.
- [121] Surgand JS, Rodrigo J, Kellenberger E, Rognan D. A chemogenomic analysis of the transmembrane binding cavity of human G-protein-coupled receptors. *Proteins*. (2006) 62: 509-538.

- [122] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. (2006) 444: 1027-1031.
- [123] Haber EP, Procopio J, Carvalho CR, Carpinelli AR, Newsholme P, Curi R. New insights into fatty acid modulation of pancreatic beta-cell function. *Int Rev Cytol* (2006) 248: 1-41.
- [124] Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershfinkel M, Walker MD. Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) 335: 97-104.
- [125] Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR Jr, Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* (2003) 278: 11303–11311.
- [126] Salehi A, Flodgren E, Nilsson NE, Jimenez-Feltstrom J, Miyazaki J, Owman C, Olde B. Free fatty acid receptor 1 (FFA(1)R/GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion. *Cell Tissue Res* (2005) 322: 207-215.
- [127] Tomita T, Masuzaki H, Iwakura H, Fujikura J, Noguchi M, Tanaka T, Ebihara K, Kawamura J, Komoto I, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Doi R, Shimada Y, Hosoda K, Imamura M, Nakao K. Expression of the gene for a membrane-bound fatty acid receptor in the pancreas and islet cell tumours in humans: evidence for GPR40 expression in pancreatic betacells and implications for insulin secretion. *Diabetologia* (2006) 49: 962-968.
- [128] Del Guerra S, Bugliani M, D'Aleo V, Del Prato S, Boggi U, Mosca F, Filipponi F, Lupi R. G-protein-coupled receptor 40 (GPR40) expression and its regulation in human pancreatic islets: the role of type 2 diabetes and fatty acids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. (2010) 20: 22-25.
- [129] Black JW and Leff P. Operational models of pharmacological agonism. *Proc Roy Soc London – Ser B: Biol Sci* (1983) 220: 141-162.
- [130] Haga H, Yamada R, Ohnishi Y, Nakamura Y and Tanaka T. Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 190562 genetic variations in the human genome. *J Hum Genet* (2002) 47: 605-610.
- [131] Latour MG, Alquier T, Oseid E, Tremblay C, Jetton TL, Luo J, Lin DC, Poitout V. GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes* (2007) 56: 1087-1094.

- [132] Stoddart LA, Smith NJ, Milligan G. International Union of Pharmacology. LXXI. Free fatty acid receptors FFA1, -2, and -3: pharmacology and pathophysiological functions. *Pharmacol Rev* (2008) 60: 405-417.
- [133] Hardy S, St-Onge GG, Joly E, Langelier Y, Prentki M. Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *J Biol Chem* (2005) 280: 13285–13291.
- [134] Stoddart LA, Brown AJ, Milligan G. Uncovering the pharmacology of the G protein-coupled receptor GPR40: high apparent constitutive activity in guanosine 5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding studies reflects binding of an endogenous agonist. *Mol Pharmacol*. (2007) 71: 994-1005.
- [135] Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C and Olde B. A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 301: 406–410.
- [136] Feng DD, Luo Z, Roh SG, Hernandez M, Tawadros N, Keating DJ, Chen C. Reduction in voltage-gated K<sup>+</sup> currents in primary cultured rat pancreatic beta-cells by linoleic acids. *Endocrinology*. (2006) 147: 674-682.
- [137] Hara T, Hirasawa A, Sun Q, Koshimizu TA, Itsubo C, Sadakane K, Awaji T, Tsujimoto G. Flow cytometry-based binding assay for GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1). *Mol Pharmacol* (2009) 75: 85-91.
- [138] Briscoe CP, Peat AJ, McKeown SC, Corbett DF, Goetz AS, Littleton TR, McCoy DC, Kenakin TP, Andrews JL, Ammala C, Fornwald JA, Ignar DM, Jenkinson S. Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules. *Br J Pharmacol* (2006) 148: 619–628.
- [139] Sum CS, Tikhonova IG, Neumann S, Engel S, Raaka BM, Costanzi S, Gershengorn MC. Identification of residues important for agonist recognition and activation in GPR40. *J Biol Chem* (2007) 282: 29248-29255.
- [140] Garrido DM, Corbett DF, Dwornik KA, Goetz AS, Littleton TR, McKeown SC, Mills WY, Smalley TL Jr, Briscoe CP, Peat AJ. Synthesis and activity of small molecule GPR40 agonists. *Bioorg Med Chem Lett* (2006) 16: 1840-1845.
- [141] Christiansen E, Urban C, Merten N, Liebscher K, Karlsen KK, Hamacher A, Spinrath A, Bond AD, Drewke C, Ullrich S, Kassack MU, Kostenis E, Ulven T. Discovery of potent and selective agonists for the free fatty acid receptor 1 (FFA(1)/ GPR40), a potential target for the treatment of type II diabetes. *J Med Chem* (2008) 51: 7061-7064.
- [142] Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* (2005) 11: 90-94.

- [143] Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ. The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* (2003) 278: 11312–11319.
- [144] Le Poul E, Loison C, Struyf S, Springael JY, Lannoy V, Decobecq ME, Brezillon S, Dupriez V, Vassart G, Van Damme J, Parmentier M, Detheux M. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J Biol Chem* (2003) 278: 25481-25489.
- [145] Nilsson NE, Kotarsky K, Owman C and Olde B. Identification of a free fatty acid receptor, FFA(2)R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 303: 1047-1052.
- [146] Alquier T and Poitout V. GPR40: good cop, bad cop? *Diabetes* (2009) 58: 1035-1036.
- [147] Doshi LS, Brahma MK, Sayyed SG, Dixit AV, Chandak PG, Pamidiboina V, Motiwala HF, Sharma SD, Nemmani KVS. Acute administration of GPR40 receptor agonist potentiates glucose-stimulated insulin secretion in vivo in the rat. *Metabolism* (2009) 58: 333-343.
- [148] Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Sener A, Hallerstrom C. Participation of endogenous fatty acids in the secretory activity of the pancreatic B-cell. *Biochem J* (1985) 227: 995-1002.
- [149] Warnotte C, Gilon P, Nenquin M, Henquin JC. Mechanism of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids: A study of palmitate effects in mouse B-cell. *Diabetes* (1994) 43: 703-711.
- [150] Aizawa T, Sato Y, Ishihara F, Taguchi N, Komatsu M, Suzuki N, Hashizume K, Yamada T. ATP-sensitive  $K^+$  channel-independent glucose action in rat pancreatic beta-cell. *Am J Physiol* (1994) 266: 622-627.
- [151] Meredith M, Rabaglia ME, Metz SA. Evidence of a role for GTP in the potentiation of  $Ca^{2+}$ -induced insulin secretion by glucose in intact rat islets. *J Clin Invest* (1995) 96: 811-821.
- [152] Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* (1995) 44: 863-870.
- [153] Haber EP, Ximenes HMA, Proco' Pio J, Carvalho CRO, Curi R, Carpinelli AR. Pleiotropic Effects of Fatty Acids on Pancreatic  $\beta$ -Cells. *J Cell Physiol* (2003) 194: 1-12.

- [154] Roduit R, Masiello P, Wang SP, Mitchell GA, Prentki M. A role for hormone-sensitive lipase in glucose-stimulated insulin secretion: A study in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Diabetes* (2001) 50: 1970-1975.
- [155] Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty acid cycle: Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* (1963) 1: 785-789.
- [156] Ordway RW, Singer JJ, Wash JV. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci* (1991) 14: 96-100.
- [157] Needleman P, Turk J, Jackschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* (1986) 55: 69-102.
- [158] Piomelli D, Volterra A, Dale N, Siegelbaum SA, Kandel ER, Schwartz JH, Belardetti F. Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of aplysia sensory cells. *Nature* (1987) 328: 38-43.
- [159] Dumoulin M, Salvail D, Gaudreault SB, Cadieux A, Rousseau E. Epoxyeicosatrienoic acids relax airway smooth muscles and directly activate reconstituted KCa channels. *Am J Physiol* (1998) 275: 423-431.
- [160] Ito Y, Murai Y, Ishibashi H, Onoue H, Akaike N. The prostaglandin E series modulates high-voltage-activated calcium channels probably through the EP3 receptor in rat para tracheal ganglia. *Neuropharmacology* (2000) 39: 181-191.
- [161] Ikari A, Sakai H, Tanaka A, Ikeda A, Inoue K, Takeguchi N. Prostaglandin E(2)-activated housekeeping Cl<sup>-</sup> channels in the basolateral membrane of rat gastric parietal cells. *Jpn J Physiol* (1999) 49: 365-372.
- [162] Kurachi Y, Ito H, Sugimoto T, Shimizu T, Miki I, Ui M. Arachidonic acid metabolites as intracellular modulators of the G protein-gated cardiac K<sup>+</sup> channel. *Nature* (1989) 337: 555-557.
- [163] Takenaka T, Horie H, Hori H. Effects of fatty acids on membrane currents in the squid giant axon. *J Membr Biol* (1987) 95: 113-120.
- [164] Ordway RW, Walsh JV Jr, Singer JJ. Arachidonic acid and other fatty acids directly activate potassium channels in smooth muscle cells. *Science* (1989) 244: 1176-1179.
- [165] Dunphy JT, Linder ME. Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim Biophys Acta* (1998) 1436: 245-261.
- [166] Tanford C. The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* (1978) 200: 1012-1018.

- [167] Yamaguchi T, Kaneda M, Kakinuma K. Effect of saturated and unsaturated fatty acids on the oxidative metabolism of human neutrophils. The role of calcium ion in the extracellular medium. *Biochim Biophys Acta* (1986) 861: 440-446.
- [168] Yajima H, Komatsu M, Yamada S, Straub SG, Kaneko T, Sato Y, Yamauchi K, Hashizume K, Sharp GW, Aizawa T. Cerulenin, an inhibitor of protein acylation, selectively attenuates nutrient stimulation of insulin release: A study in rat pancreatic islets. *Diabetes* (2000) 49: 712-717.
- [169] Khan FA, Goforth PB, Zhang M, Suzuki K, Matsuoka T, Nakamura M, Tatsumi H, Yamasaki Y, Kamada T, Taniguchi N. Insulin activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Diabetes* (2001) 50: 2192-2198.
- [170] Turk J, Wolf BA, McDaniel ML. The role of phospholipid-derived mediators including arachidonic acid, its metabolites, and inositoltriphosphate and of intracellular Ca<sup>2+</sup> in glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets. *Prog Lipid Res* (1987) 26: 125-181.
- [171] Deeney JT, Cunningham BA, Chheda S, Bokvist K, Juntti-Berggren L, Lam K, Korchak HM, Corkey BE, Berggren PO. Reversible Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation of protein kinase C and glucose-induced insulin release. *J Biol Chem* (1996) 271: 18154-18160.
- [172] Hughes SJ, Ashcroft SJ. Cyclic AMP, protein phosphorylation and insulin secretion. In: Flatt P, editor. *Nutrient regulation of insulin secretion*. Londres: Portland Press (1992) 271-288.
- [173] Harris TE, Persaud SJ, Jones PM. Atypical isoforms of PKC and insulin secretion from pancreatic beta-cells: Evidence using Go 6976 and Ro 31-8220 as Pkc inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* (1996) 227: 672-676.
- [174] Littman ED, Pitchumoni S, Garfinkel MR, Opara EC. Role of protein kinase C isoenzymes in fatty acid stimulation of insulin secretion. *Pancreas* (2000) 20: 256-263.
- [175] Majumdar S, Rossi MW, Fujiki T, Phillips WA, Disa S, Queen CF, Johnston RB, Jr., Rosen OM, Corkey BE, Korchak HM. Protein kinase C isotypes and signaling in neutrophils. Differential substrate specificities of a translocatable calcium- and phospholipid-dependent beta-protein kinase C and a phospholipid-dependent protein kinase which is inhibited by long chain fatty acyl coenzyme A. *J Biol Chem* (1991) 266: 9285-9294.
- [176] Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* (1999) 103: 253-259.

- [177] Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* (1997) 277: 567-570.
- [178] Cho Y and Ziboh VA. Expression of protein kinase C isozymes in guinea pig epidermis: Selective inhibition of PKC-beta activity by 13-hydroxyoctadecadienoic acid-containing diacylglycerol. *J Lipid Res* (1994) 35: 913-921.
- [179] Hwang D, Rhee SH. Receptor-mediated signaling pathways: Potential targets of modulation by dietary fatty acids. *Am J Clin Nutr* (1999) 70: 545-556.
- [180] Schubert KM, Scheid MP, Duronio V. Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J Biol Chem* (2000) 275: 13330-13335.
- [181] Cazzolli R, Carpenter L, Biden TJ, Schmitz-Peiffer C. A role for protein phosphatase 2A-like activity, but not atypical protein kinase C $\zeta$ , in the inhibition of protein kinase B/Akt and glycogen synthesis by palmitate. *Diabetes* (2001) 50: 2210-2218.
- [182] Alquier T, Peyot ML, Latour MG, Kebede M, Sorensen CM, Gesta S, Kahn CR, Smith RD, Jetton TL, Metz TO, Prentki M, Poitout V. Deletion of GPR40 impairs glucose-induced insulin secretion in vivo in mice without affecting intracellular fuel metabolism in islets. *Diabetes* (2009) 58: 2607-2615.
- [183] Katsuma S, Hatae N, Yano T, Ruike Y, Kimura M, Hirasawa A, Tsujimoto G. Free fatty acids inhibit serum deprivation-induced apoptosis through GPR120 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *J Biol Chem* (2005) 280: 19507-19515.
- [184] Christiansen E, Due-Hansen ME, Urban C, Grundmann M, Schröder R, Hudson BD, Milligan G, Cawthorne MA, Kostenis E, Kassack MU, Ulven T. Free fatty acid receptor 1 (FFA1/GPR40) agonists: mesylpropoxy appendage lowers lipophilicity and improves ADME properties. *J Med Chem* (2012) 55: 6624-6628.
- [185] Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, Chen S, McGarry JD. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest* (1996) 97: 2728-2735.
- [186] Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab* (2005) 1: 245-258.
- [187] Lachelin GC, Barnett M, Hopper BR, Brink G, Yen SS. Adrenal function in

- normal women and women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* (1979) 49: 892-898.
- [188] Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* (2005) 307: 380-384.
- [189] Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* (2005) 54: 97-107.
- [190] Yashiro H, Tsujihata Y, Takeuchi K, Hazama M, Johnson PR, Rorsman P. The effects of TAK-875, a selective G protein-coupled receptor 40/free fatty acid 1 agonist, on insulin and glucagon secretion in isolated rat and human islets. *J Pharmacol Exp Ther.* (2012) 340: 483-489.
- [191] Leifke E, Naik H, Wu J, Viswanathan P, Demanno D, Kipnes M, Vakilynejad M. A multiple-ascending-dose study to evaluate safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a novel GPR40 agonist, TAK-875, in subjects with type 2 diabetes. *Clin Pharmacol Ther.* (2012) 92: 29-39.
- [192] Burant CF, Viswanathan P, Marcinak J, Cao C, Vakilynejad M, Xie B, Leifke E. TAK-875 versus placebo or glimepiride in type 2 diabetes mellitus: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* (2012) 379: 1403-1411.
- [193] Hara T, Hirasawa A, Sun Q, Sadakane K, Itsubo C, Iga T, Adachi T, Koshimizu T, Hashimoto T, Asakawa Y, Tsujimoto G. Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* (2009) 380: 247-255.

## 9 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Christiansen E, Urban C, Merten N, Liebscher K, Karlsen KK, Hamacher A, Spinrath A, Bond AD, Drewke C, Ullrich S, Kassack MU, Kostenis E, Ulven T. Discovery of potent and selective agonists for the free fatty acid receptor 1 (FFA(1)/ GPR40), a potential target for the treatment of type II diabetes. *J Med Chem* (2008) **51**: 7061-7064.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Häring danke ich recht herzlich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Abteilung Innere Medizin IV anfertigen zu dürfen.

Einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit verdanke ich meiner Betreuerin und Doktormutter Frau Prof. Dr. Susanne Ullrich. Ihr bin ich besonders dankbar für die interessante Themenstellung, die Möglichkeit zum Erlernen neuer wissenschaftlicher Techniken, die stets freundliche und fachkompetente Betreuung sowie für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Auch bei der Korrektur dieser Arbeit war sie mir eine große Hilfe. Des Weiteren bedanke ich mich für ihre Tätigkeit als Erstgutachter dieser Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung Innere Medizin IV bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und die überaus freundliche Arbeitsatmosphäre. Vor allem danke ich Dr. Felicia Ranta, Dr. Diana Michael, Frau Ying Zhang, Frau Sieglinde Haug und Frau Elisabeth Metzinger für die Einführung in neue Arbeitstechniken, die Unterstützung bei Tätigkeiten im Labor, die erhaltenen Ratschläge und das geduldige Beantworten meiner Fragen.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern und meinem Freund für ihren kontinuierlichen moralischen Zuspruch sowie ihre finanzielle Unterstützung während dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums. Sie haben mich zu dem gemacht, was ich heute bin.