

Aus der Medizinischen Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin IV  
(Schwerpunkt: Endokrinologie und Diabetologie, Angiologie,  
Nephrologie und Klinische Chemie)  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring

## Regulation der Insulinsekretion und Inselgröße in Wildtyp und PKC $\delta$ transgenen Mäusen

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Isabel Franziska Heinzelmann  
aus  
Rastatt

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Frau Professor Dr. S. Ullrich

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. T. Wieder



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Die Bedeutung der regelrechten Insulinsekretion . . . . .	8
1.2 Das endokrine Pankreas . . . . .	10
1.3 Die Insulin sezernierende Zelle . . . . .	11
1.4 Regulation der Insulinsekretion über Metabolismus . . . . .	14
1.5 Regulation der Insulinsekretion durch Fettsäuren . . . . .	16
1.6 Die Proteinkinase C . . . . .	19
1.6.1 Die Aktivierung atypischer PKCs . . . . .	21
1.6.2 Die Rolle der Proteinkinase C bei der Insulinsekretion . . . . .	21
1.6.3 Die Rolle der Proteinkinase C bei der Insulinresistenz . . . . .	23
1.6.4 Die Proteinkinase C in transgenen Mausmodellen . . . . .	24
1.6.5 Die Rolle der Proteinkinase C in der Regulation der $\beta$ - Zell- masse und -differenzierung . . . . .	24
1.6.6 Weitere Funktionen der Proteinkinase C . . . . .	25
1.7 Die PKC $\delta$ . . . . .	25
1.7.1 Die Struktur der Isoform PKC $\delta$ . . . . .	26
1.7.2 Die Aktivierung der PKC $\delta$ . . . . .	27
1.7.3 Die pro- apoptotische Wirkung von PKC $\delta$ . . . . .	28
1.7.4 PKC $\delta$ aktiviert den intrinsischen Apoptoseweg . . . . .	30
1.7.5 Weitere Funktionen der PKC $\delta$ . . . . .	31
1.7.6 Die Rolle der PKC $\delta$ bei der Insulinresistenz . . . . .	32
1.7.7 Die Rolle der PKC $\delta$ in der $\beta$ - Zelle . . . . .	33
1.7.8 Zusammenfassung der Rolle und Funktion der PKC $\delta$ . . . . .	33
1.8 Ziel der Arbeit . . . . .	34
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>36</b>
2.1 Mäuse . . . . .	36
2.1.1 Generation der transgenen Mäuse . . . . .	37
2.1.2 Behandlung der Mäuse . . . . .	37
2.2 Sekretionsmessungen . . . . .	39
2.2.1 Genotypisierung . . . . .	39
2.2.2 Verwendete Substanzen . . . . .	40
2.2.3 Verwendete Lösungen . . . . .	41
2.2.4 Isolation der Inseln . . . . .	47
2.2.5 Kultur der Inseln . . . . .	48
2.2.6 Vorinkubation der Inseln . . . . .	49
2.2.7 Inkubation der Inseln . . . . .	49
2.2.8 Messung der Insulinkonzentration . . . . .	50
2.3 Die Immunhistochemie . . . . .	50
2.3.1 Verwendete Substanzen . . . . .	50

2.3.2	Verwendete Lösungen . . . . .	51
2.3.3	Die Kryoschnitte . . . . .	51
2.3.4	Die Färbung . . . . .	52
2.3.5	Das Ausmessen der Inseln . . . . .	52
2.4	Auswertung der Ergebnisse . . . . .	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
3.1	Die Glucose- induzierte Insulinsekretion in WT und PKC $\delta$ KN Inseln	54
3.2	Insulinsekretion in WT und PKC $\delta$ KN Inseln bei Stimulation mit Fors- kolin und PMA . . . . .	56
3.3	Insulinsekretion in WT und PKC $\delta$ KN Inseln nach Inkubation mit Fettsäuren . . . . .	57
3.4	Insulinsekretion in WT und PKC $\delta$ KN Inseln bei Stimulation mit Car- bachol und GPR40 Agonist . . . . .	59
3.5	Insulingehalt der WT und PKC $\delta$ KN Mäuse . . . . .	60
3.6	Immunhistochemie . . . . .	60
3.6.1	Immunhistochemischer Insulinnachweis nach normaler Di- ät der Mäuse . . . . .	61
3.6.2	Insulin positive Fläche ( $\beta$ - Zellmasse) im gesamten Gewe- be nach normaler Diät der Mäuse . . . . .	62
3.6.3	Inselfläche im Bezug zur Pankreasgesamtfläche nach nor- maler Diät der Mäuse . . . . .	64
3.6.4	Immunhistochemischer Insulinnachweis nach HFD der Mäu- se . . . . .	65
3.6.5	Insulin positive Fläche ( $\beta$ - Zellmasse) im gesamten Gewe- be nach HFD der Mäuse . . . . .	65
3.6.6	Inselfläche im Bezug zur Pankreasgesamtfläche nach HFD der Mäuse . . . . .	68
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>70</b>
4.1	Die Rolle der PKC $\delta$ in der Insulinsekretion . . . . .	70
4.2	Die PKC $\delta$ in der Regulation der Inselmasse . . . . .	72
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>78</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>80</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>92</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>93</b>

# Abkürzungsverzeichnis

ABC- Reagenz .	Antikörper gegen Biotin mit Peroxidaseaktivität
AEC- Reagenz .	Peroxidasesubstrat
Akt .....	Genname der Proteinkinase B
aPKC .....	atypische Proteinkinase C
ATP .....	Adenosintriphosphat
Bcl-2 .....	anti- apoptotisches Protein/B-cell lymphoma 2
BMI .....	Body Mass Index
BRIN-BD11 ....	Zelllinie aus Inselzellen von Ratten
BSA .....	Bovines Serumalbumin
c-Abl .....	Tyrosinkinase in der Zellmembran
cAMP .....	zyklisches Adenosin Monophosphat
cPKC .....	klassische Proteinkinase C
Crm-1 .....	Export- Rezeptor
DAG .....	Diacylglycerol
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
DNA .....	Desoxyribonukleinsäure
DPPIV .....	Dipeptidyl Peptidase IV
Ebp1 .....	ErbB3- binding Protein
EGFR .....	Epidermal Growth Factor Receptor
Erk .....	Extracellular-signal Regulated Kinase/zählen zu den MAPK
Fas .....	Rezeptor in der Apoptose
FCS .....	Fötales Kälber Serum/ foetal calf serum
FFAR .....	Free Fatty Acid Receptor
GIP .....	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid/Gastrin inhibitorisches Peptid
GK- Ratte .....	Goto Kakizaki diabetische Ratte
GLP-1 .....	Glukagon like Peptide-1
GLUT .....	Glucose Transporter
GPR40 .....	Orphan Receptor/ G- Protein gekoppelter Rezeptor = FFAR1
HeLa .....	Zelllinie aus Epithelzellen eines Zervixcarcinom
Hepes .....	N-2-Hydroxyäthyl-piperazin-ethansulfonsäure
HSP27 .....	Heat Shock Protein 27
IDDM .....	Insulin Dependent Diabetes mellitus = Typ 1 Diabetes mellitus
IKK $\alpha$ .....	reguliert die Aktivierung von NF $\kappa$ B
INS-1 .....	Zelllinie aus Insulinomzellen
IP3 .....	Inositoltriphosphat
IRS-1+2 .....	Insulinrezeptorsubstrat 1+ 2
Jak .....	Januskinase
JNK .....	Mitglied der MAP Kinasefamilie
K <sub>ATP</sub> .....	ATP abhängiger Kalium Kanal
Kir6.2 .....	K <sup>+</sup> inward rectifier
KN .....	Kinase negativ

Lyn .....	Tyrosinkinase
MAPK .....	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MODY .....	Maturity Onset Diabetes of the Young
NF $\kappa$ B .....	Nuclear Factor $\kappa$ B, Transkriptionsfaktor
NIDDM .....	Non Insulin Dependent Diabetes mellitus = Typ 2 Diabetes mellitus
NLS .....	Nuclear Localization Site
NO .....	Stickstoffmonoxid
nPKC .....	neue Proteinkinase C
p38 .....	Mitglied der MAP Kinasefamilie
p53 .....	Tumorsupressorgen
PBS .....	Phosphate bufferd Saline
PI3K .....	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub> .....	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKB .....	Proteinkinase B
PKC .....	Proteinkinase C
PLC .....	Phospholipase C
PMA .....	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PPAR .....	Peroxisome Proliferator Activator Receptor
RACK .....	Receptor for Activated Kinase
Ras .....	kleines G- Protein
RIN1046-38 ....	Insulinsezernierende Zelllinie
ROS .....	Reactive Oxygen Species
SNARE .....	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-Factor Attachment Receptor
Src .....	zytosolische Proteinkinase
STAT1 .....	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
SUR1 .....	Sulfonylharnstoffrezeptor
TAG .....	Triacylglycerin
TLR .....	Toll Like Rezeptor
TNF- $\alpha$ .....	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TPA .....	Tetradecanoyl-Phorbolacetat
U937 Zellen ....	Zelllinie dendritischer Zellen
Wistar Ratte ...	Ratte mit unauffälligem Phänotyp
WT .....	Wildtyp Maus
Z-DEVD-FMK ..	Asp-Glu-Val-Asp-O-Methyl-Fluormethylketon, Caspase 3 Inhibitor
Zucker Ratte ...	Tiermodell für adipöses prädiabetisches Stadium

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung der regelrechten Insulinsekretion

Die regelrechte Insulinsekretion hat im menschlichen Organismus eine sehr große Bedeutung. Ist sie nicht gewährleistet so äußert sich dies im Krankheitsbild des Diabetes mellitus oder seiner Vorstufe, der gestörten Glucosetoleranz. Weltweit werden im Jahr 2025 5,4 % der gesamten Bevölkerung an Diabetes mellitus erkrankt sein. Dies sind 300 Millionen Erwachsene, die unter den Folgen der Erkrankung leiden werden [45]. In Deutschland sind ungefähr 7- 8 % der Bevölkerung von einer Diabetes mellitus Erkrankung betroffen, bei immer weiter steigender Inzidenz. Mit 7,4 Millionen Diabetikern steht Deutschland auf Platz fünf der Länder mit den meisten Erkrankten [1].

Die physiologischen Blutglucosewerte liegen zwischen 80- 110 mg/dl (4,4- 6,1 mmol/l). Laut WHO spricht man ab Nüchternblutzuckerwerten über 110 mg/dl (=6,1 mmol/l) von gestörter Glucosetoleranz beziehungsweise von „Impaired Glucose Tolerance“ und ab Nüchternwerten über 126 mg/dl (=7 mmol/l) von Diabetes mellitus.

Auch wenn man heute weiss, dass es noch weitere Formen und Unterformen des Diabetes mellitus gibt, unterscheidet man vor allem den Typ 1 und den Typ 2 Diabetes. Beim Typ 1 Diabetes handelt es sich vorwiegend um eine autoimmunologische Erkrankung, die zu einer Zerstörung der  $\beta$ - Zellen führt. Er wird synonym auch als Insulin- Dependent- Diabetes Mellitus (IDDM) bezeichnet. Häufig wurde auch die Bezeichnung juveniler Diabetes benutzt, da der Erkrankungsbeginn des klassischen Typ 1 Diabetes häufig im Kindes- und Jugendalter liegt, im Gegensatz zum Typ 2 Diabetes, der deshalb oft als Altersdiabetes bezeichnet wurde. Allerdings ist man hier heute zurückhaltender, seit weitere Diabetes- Formen unterschieden werden und eine Inzidenzzunahme von Typ 2 Diabetes bei Kindern vor allem in Nordamerika berichtet wird [1]. Heute kennt man des Weiteren MODY ( Maturity- onset Diabetes in the Young) und LADA ( Late- Onset Autoimmunity Diabetes in the Adult) um nur zwei Formen zu nennen, die nicht in das strikte Muster des Typ 1 und 2 Diabetes passen. MODY ist durch einen Krankheitsbeginn vor dem 25. Lebensjahr, einem autosomal- dominanten Erbgang ( z.B. Mutation des Glukokinase Gens) und einem primären  $\beta$ - Zelldefekt charakterisiert.



Hier ist trotz des frühen Erkrankungsalters eine Therapie aus Diät, Bewegung und oralen Antidiabetika sinnvoll [2]. Im Gegensatz dazu diagnostiziert man LADA mit einem Erkrankungsalter nach dem 40. Lebensjahr, einer autoimmunen Genese und einer meist schnell eintretenden Insulinpflichtigkeit [2].

Beim sehr häufig vorkommenden Typ 2 Diabetes, der etwa 85 %- 95 % aller Diabetesfälle ausmacht [13] steht im Gegensatz zum Typ 1 Diabetes eine multifaktorielle Vererbung und ganz besonders Umweltfaktoren, wie hochkalorische Ernährung und Bewegungsmangel als Erkrankungsursachen im Vordergrund. Für den Typ 2 Diabetes wird auch der Ausdruck NIDDM, (Non- Insulin- Dependent- Diabetes Mellitus) verwendet, da beim Typ 2 Diabetes immer zuerst andere Therapieoptionen als die reine Insulintherapie möglich sind. Der genaue Pathomechanismus des Typ 2 Diabetes ist nicht völlig verstanden und nach wie vor Inhalt intensiver Forschung.

Es kommt zu einer Insulinresistenz und auch hier zu einer  $\beta$ - Zell Dysfunktion. Ob dabei die sekretorische Dysfunktion der  $\beta$ - Zelle Ursache oder Folge der Erkrankung ist, ist immer noch unklar. Auch die  $\beta$ - Zellmasse ist beim Erwachsenen plastisch und es wurden Veränderungen beobachtet. So haben adipöse, nicht an Diabetes Erkrankte deutlich vergrößerte Inseln mit mehr  $\beta$ - Zellen in den Inseln und Diabetiker haben vermehrt dismorphe, veränderte Inseln bei einer reduzierten  $\beta$ - Zellzahl [71].

Die Insulinresistenz betrifft vor allem die Peripherie und führt dazu, dass die Organe, die normalerweise hauptverantwortlich für die Aufnahme von Glucose sind, trotz vorhandenem Insulin, keine beziehungsweise nur noch vermindert Glucose aufnehmen. Insulin kann im Körper zwar auf fast alle Zellen wirken, doch die Zielorgane des Insulin, die den größten Teil der Glucosezufuhr aufnehmen und verarbeiten und damit für die Senkung des Blutglucosespiegels hauptverantwortlich sind, sind beim Menschen die Leber, die Muskulatur und das Fettgewebe [37]. Da sowohl Insulinresistenz, als auch Insulinmangel alleine zu einem gestörten Glucosestoffwechsel führen können, geht man davon aus, dass die Mischung aus Beiden auch in jedem Patient individuell etwas unterschiedlich ist. So weiss man zum Beispiel, dass lange andauernde Hyperglykämie, wie sie in der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 vorkommt, sowohl zu einer Sekretionshemmung von Insulin als auch zu einer Hemmung der Insulinwirkung führen kann [30].

Heute geht man deshalb von einer Entwicklung von der Insulinresistenz des Gewebe hin zu einem Sekretionsdefizit der  $\beta$ - Zelle aus. Dabei kommt es durch die Insulinresistenz zu einer Hyperglykämie, welche dann reflektorisch zu einer Phase der Hyperinsulinämie führt, da mehr Insulin benötigt wird, um dieselbe Menge

Glucose in die Zellen zu schaffen. Als Folge darauf kommt es zu einer „Ermüdung“ der  $\beta$ - Zellen und dadurch zu einem Insulinmangel.

## 1.2 Das endokrine Pankreas

Das menschliche Pankreas ist ein etwa 70- 90 Gramm schweres, retroperitoneal liegendes Organ, das sich vom Duodenum bis zur Milz erstreckt. Es ist eine gemischt exokrin- endokrine Drüse, die man in einen Pankreaskopf , einen Pankreaskörper und einen Pankreasschwanz einteilen kann. Der überwiegende Teil des Pankreas dient der exokrinen Sekretion von Verdauungsenzymen [3]. Das Pankreas stellt damit die wichtigste Drüse zur Verdauung von Nahrungsmitteln dar und produziert pro Tag etwa zwei Liter Verdauungssekret, das Vorstufen von Enzymen zum Verdau aller Nahrungsbestandteile enthält [37]. Es handelt sich um eine azinöse, rein seröse Drüse. Um einen Selbstverdau des Pankreas zu verhindern, werden die Enzyme erst im Darm aktiviert.

Den wesentlich kleineren, endokrinen Anteil stellen die, nach dem deutschen Medizinstudenten Paul Langerhans benannten, Langerhans'schen Inseln dar. Sie machen nur 1- 2 % der Pankreasmasse aus. Die Inseln sind kleine, meist rundliche Epithelzellkomplexe, die vor allem im Schwanz des Pankreas liegen [3]. Sie haben einen Durchmesser zwischen 75 und 225  $\mu\text{m}$  [23]. Im menschlichen Pankreas finden sich circa eine Million dieser Inseln, von denen jede Einzelne von Bindegewebe umgeben ist. Dieses enthält Arteriolen und Kapillaren über die jede Insel direkten Kontakt zum Gefäßsystem hat. Wodurch sie optimal mit Botenstoffen aus dem Blut, wie zum Beispiel Glucose oder Katecholaminen versorgt wird. Die Langerhans'schen Inseln sind für die Sekretion der Hormone Insulin, Glukagon, Somatostatin und Pankreatisches Polypeptid verantwortlich [3].

Man kann innerhalb der Inseln vier verschiedene Zelltypen unterscheiden, die jeweils eines dieser Hormone produzieren. Mit 80 % Anteil an der Inselmasse sind die  $\beta$ - Zellen, die häufigsten Zellen im Inselapparat. Sie sind für die Synthese und Freisetzung von Insulin verantwortlich. In den  $\alpha$ - Zellen, die mit 20 % den zweitgrößten Teil ausmachen, findet die Glukagon Synthese und Sekretion statt. Des Weiteren findet man die  $\delta$ - Zellen, die Somatostatin produzieren und die PP-Zellen, die für die Synthese des Pankreatischen Polypeptid verantwortlich sind [3]. Die beiden Hormone Insulin und Glukagon sind die Hauptakteure im Energiestoffwechsel, Somatostatin hemmt im Pankreas die Sekretion sowohl von Insulin als auch von Glukagon und das Pankreatische Polypeptid hat eine hemmende Wirkung auf das exokrine Pankreas.

Während Insulin für die Energiespeicherung zuständig ist, fördert sein Gegenspieler, das Glukagon, die Energiefreisetzung, vor allem in Situationen, in denen ein erhöhter Energieverbrauch stattfindet oder über längere Zeit keine neue Energie über Nahrung aufgenommen werden kann, wie es zum Beispiel beim Sport oder während des Schlafs der Fall ist. Es sorgt dafür, dass auch dann der Blutglucosespiegel im physiologischen Bereich bleibt und keine Hypoglykämie auftritt. Glukagon ist ein Peptidhormon und wirkt vor allem auf die Leber, wo es den Glykogenabbau und die Gluconeogenese fördert [37].

### 1.3 Die Insulin sezernierende Zelle

Die  $\beta$ - Zellen liegen im Zentrum der Inseln und sind von den  $\alpha$ -,  $\delta$ - und PP-Zellen umgeben [23]. Sie synthetisieren das Peptidhormon Insulin, das aus 51 Aminosäuren besteht. Insulin setzt sich aus zwei Polypeptidketten, der A- und der B-Kette, zusammen, die durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Eine dritte Disulfidkette innerhalb der A- Kette stabilisiert die Tertiärstruktur des Hormons. Insulin wird als Präproinsulin translatiert, durch die Prä- Sequenz wird es zum rauen endoplasmatischen Retikulum transportiert. Dort werden die Disulfidketten gebildet und es wird nun als Proinsulin im Golgi- Apparat in Transportvesikel verpackt. Abschließend wird es als Insulin- Zink- Komplex gelagert. Erst wenn der Blutglucosespiegel ansteigt, wird das C- Peptid aus dem Proinsulin exzidiert und es kommt zur Exozytose von reifem Insulin und dem C- Peptid [37]. Für die Exozytose ist die Erhöhung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ - Konzentration essentiell. Calcium bindet an Synaptogamin, wodurch die Exozytosemaschinerie der SNARE Proteinfamilie aktiviert wird und die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran der  $\beta$ - Zelle ermöglicht wird [39].

Die späte Spaltung von Insulin und C- Peptid führt dazu, dass immer gleiche Mengen von Beiden freigesetzt werden. Dies macht man sich bei Diabetiker zu nutzen, um festzustellen ob noch eine endogene Insulinsekretion vorhanden ist. Denn über die laborchemische Bestimmung von C- Peptid wird die endogene Insulinsekretion sicher nachgewiesen.

Insulin ist das wichtigste Hormon der menschlichen Blutzuckerregulation und im menschlichen Organismus das einzige Hormon, das für die Speicherung und Einlagerung von Energiereserven sorgt. Außerdem hat es eine wichtige anabole Wirkung und ist für Wachstum und Differenzierung notwendig [37].

Der wichtigste Reiz zur Insulinsekretion ist der Anstieg der Blutglucose während der Nahrungsaufnahme. Dafür werden zuerst die Kohlenhydrate der Nahrungs-

mittel durch Amylasen und Disaccharidasen gespalten, dann erfolgt die Glucoseresorption im Darm sekundär-aktiv. Die Glucose wird nun ins Blut abgegeben und erreicht so die verschiedenen Organe. Dort wird sie über spezielle Glucosetransporter, den sogenannten GLUTs durch erleichterte Diffusion, entsprechend des Konzentrationsgefälles in die Zellen aufgenommen. Man kann verschiedene Formen der Glucosetransporter unterscheiden, je nach Zellart und deren Bedürfnisse. So kommen GLUT 1 und 3 an Zellen vor, die zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsel essentiell auf Glucose angewiesen sind, wie Erythrozyten und die Neurone des Gehirns. Außerdem dienen sie zur Basisversorgung vieler Organe mit Glucose. Deshalb arbeiten GLUT 1 und 3 unabhängig von Insulin und haben eine hohe Affinität zu Glucose. GLUT 4 findet sich vor allem an der Muskulatur und im Fettgewebe, den Organen, die Glucose als Glykogen beziehungsweise als Fett bei großem Angebot auch speichern können. Er ist zur Glucoseaufnahme auf Insulin angewiesen und wird erst, wenn Insulin die Muskelzellen oder Adipozyten erreicht aus zytosolischen Mikrovesikeln in die Plasmamembran eingebaut. Dies dient einer schnellen, insulinabhängigen Blutglucosesenkung durch erhöhte Aufnahme in die Zellen und dortige, weitere Verstoffwechslung. Als weiteren Transporter findet man GLUT 5 der aber, wie man heute weiss eigentlich ein Fructosetransporter ist [37].

Nur im Pankreas und in den Hepatozyten der Leber findet sich der Glucosetransporter 2, über den Glucose auch in die  $\beta$ -Zellen aufgenommen wird. Dieser Glucosetransporter hat eine hohe Michaelis-Menten Konstante, also eine niedrige Affinität zu Glucose. Dies bedeutet, dass die Glucoseaufnahme der  $\beta$ -Zelle in physiologischen Konzentrationen von 5 mM nicht maximal ist, bei Nahrungsaufnahme aber gesteigert werden kann. In Zeiten niedriger Glucosekonzentrationen im Blut, kann kaum Glucose in die  $\beta$ -Zelle aufgenommen werden und es wird kein Insulin sezerniert.

Ergänzt wird dieser Mechanismus dadurch, dass in der  $\beta$ -Zelle die Glucose zuerst durch die Glucokinase zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert wird. Damit wird Glucose aus dem Gleichgewicht entfernt und neue Glucose kann in die Zelle gelangen. Die Glucokinase ist ein Isoenzym der Hexokinase und kommt nur in der Leber und den  $\beta$ -Zellen des Pankreas vor. Sie hat wie der GLUT 2 eine hohe Michaelis-Menten Konstante und eine niedrige Glucoseaffinität. Sie arbeitet also, im Gegensatz zur ubiquitär vorkommenden Hexokinase, die immer maximal phosphoryliert, nur bei großem Glucoseangebot mit maximaler Geschwindigkeit und stellt damit zusammen mit dem GLUT 2 den  $\beta$ -Zellsensor der Blutglucosekonzentration dar [37].

Glucose- 6- Phosphat wird in der Glykolyse dann weiter zu Pyruvat abgebaut. Das Pyruvat wird anschließend im Citratzyklus und der darauf folgenden Atmungskette zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  metabolisiert. Bei optimaler Stoffwechsellage können dabei bis zu 36 ATP Moleküle aus einem Mol Glucose entstehen. Dies hat zur Folge, dass bei Nahrungsaufnahme beziehungsweise bei Glucoseaufnahme in die Zelle der intrazelluläre ATP- Gehalt ansteigt.

Der Anstieg der intrazellulären ATP- Konzentration in der  $\beta$ - Zelle bei Erhöhung der Blutglucosekonzentration, führt zum Verschluss des ATP sensitiven Kalium Kanals der  $\beta$ - Zelle, was zu einer Depolarisation der  $\beta$ - Zelle führt. Als Folge der Depolarisation kommt es zum  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom über spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle in die  $\beta$ - Zelle und dadurch letztendlich zur Exozytose der Insulingranula. Man kann sagen, dass der  $\text{K}_{ATP}$  Kanal also im eigentlichen Sinne das Glucose-signal in elektrische Aktivität umwandelt [4].

Der  $\text{K}_{ATP}$  Kanal besteht aus jeweils vier Untereinheiten SUR1 (sulfonylurea receptor) und Kir 6.2 (  $\text{K}^+$  channel inward rectifier) und ist nur als Oktamer voll funktionsfähig. SUR1 ist das Zielmolekül der Sulfonylharnstoffe, die als erste orale Antidiabetika bekannt wurden. Die Sulfonylharnstoffe verschließen den  $\text{K}_{ATP}$  Kanal und sorgen so für eine verlängerte Depolarisation und einen verlängerten  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom. Die Kir6.2 Untereinheit ist der porenbildende Anteil des Kanals. Seit einiger Zeit kennt man Mutationen in KCNJ11, dem Gen, das für Kir 6.2 codiert und weiss, dass dies ein häufiger Grund für einen Neugeborenen Diabetes ist [4]. Seit man den Zusammenhang zwischen der Erkrankung und dem Mutationsort kennt, kann man Neugeborenen Diabetes mit Sulfonylharnstoffen erfolgreich behandeln.

Als Reaktion auf einen Glucosestimulus beobachtet man eine biphasische Insulinsekretion. Es kommt zuerst zu einem kurzen, schnellen Peak in den ersten 5- 10 Minuten und dann zu einer verlängerten, aber weniger starken Insulinausschüttung. Vor allem die erste Phase der Insulinantwort scheint bei Diabetikern vermindert zu sein und es wird diskutiert, dass eine verminderte erste Phase ein deutlicher Prädiktor für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes ist [2]. Es wird vermutet, dass der biphasische Sekretionsverlauf dadurch zu Stande kommt, dass die Insulingranula unterschiedlich weit von der Plasmamembran entfernt sind. Es gibt einen Pool der direkt an der Membran liegt (ready releasable pool) und damit sofort zur ersten Phase ausgeschüttet wird und es gibt Reservegranula, die, da sie etwas entfernt sind, erst zur zweiten Phase ausgeschüttet werden [39].

Interessanterweise beginnt nach etwa 3 Stunden bei stimulierender Glucosekonzentration eine dritte Phase der Sekretion, in der die sezernierte Insulinmen-

ge deutlich absinkt [23]. Dies deutet an, dass lange anhaltende Hyperglykämie selbst zu einer Reduzierung der Insulinsekretion führt. Diese Reaktion und die Tatsache, dass Hyperglykämie auch die Insulinwirkung in der Peripherie vermindert und zur  $\beta$ -Zell Zerstörung führen kann [86], ist Teil dessen, was man unter Glucotoxizität versteht. Außerdem konnten Dubois und Mitarbeiter zeigen, dass die Hyperglykämie die letzten Schritte der Exozytose hemmt und dadurch die Insulinsekretion reduziert [25]. Hyperglykämie als Folge von Sekretionsdefiziten der  $\beta$ -Zelle und Insulinresistenz in der Peripherie, führt also selbst zur Erhaltung und Verschlimmerung der diabetischen Stoffwechsellaage.

## 1.4 Regulation der Insulinsekretion über Metabolismus

Die Insulinsekretion wird vor allem durch die Aufnahme und Verstoffwechslung von Glucose, als dem hauptsächlichsten Sekretionsstimulus, reguliert. Außer Glucose sind zum Beispiel noch Mannose oder Leucin in der Lage die Insulinsekretion direkt zu stimulieren. Im Gegensatz dazu, kann die Insulinantwort auch noch von vielen weiteren Stoffen moduliert werden. So können Fettsäuren auf verschiedenen Wegen Einfluss auf die Sekretion nehmen und diese vermehren (siehe 1.5 Regulation der Insulinsekretion durch Fettsäuren). Aber auch Aminosäuren und Ketonkörper potenzieren die Insulinausschüttung [37]. Man unterscheidet deshalb zwischen primären und sekundären Auslösern der Insulinsekretion. Primär bedeutet, dass Stimulanz kann alleine, wie zum Beispiel Glucose oder Mannose eine Sekretionsantwort provozieren. Sekundäre Stimulanzien sind dahingegen auf die Gegenwart von Glucose angewiesen, nur dann können sie ihre stimulierende Wirkung entfalten [23].

Es konnte gezeigt werden, dass über die parasymphatische Nervenfasern des Nervus vagus ausgeschüttetes Acetylcholin die Insulinsekretion ebenfalls stimuliert. Das Acetylcholin wirkt über muskarinerge Rezeptoren an den  $\beta$ -Zellen. Der muskarine Rezeptor ist G-Protein gekoppelt und führt bei Aktivierung zu einer Stimulierung der PLC (Phospholipase C), welche das Phospholipid  $\text{PIP}_2$  (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) aus der Plasmamembran in die second messenger DAG (Diacylglycerin) und  $\text{IP}_3$  (Inositoltriphosphat) spaltet.  $\text{IP}_3$  führt dann zur Freisetzung von Calcium, indem es an  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle des endoplasmatischen Retikulum bindet und diese öffnet.  $\text{Ca}^{2+}$  ist ein Ion, das als second messenger viele verschiedene Aufgaben erfüllt. Es kann an Calmodulin binden

und dadurch Enzym- oder Transporter Aktivität verändern, es kann regulatorische Proteine binden und dadurch die Bewegung kontraktiler oder zytoskelettaler Proteine beeinflussen, es führt zur Exozytose und es kann regulierend an Ionenkanäle binden [70]. DAG aktiviert dahingegen die Proteinkinase C (PKC), die ihrerseits wiederum andere Enzyme aktivieren kann, die das Signal weiterleiten [70].

Die gleiche Stimulationskaskade aktiviert Carbachol, das als Strukturanalogon zu Acetylcholin, direkt als Parasympathomimetikum wirkt. In unseren Studien wurden die Inseln der WT Mäuse und der PKC $\delta$ KN Mäuse mit Carbachol inkubiert und so die Insulinsekretion unter Stimulierung der PLC Signalkaskade untersucht.

Als weiteres Stimulanz, der Insulinsekretion wurde in unseren Experimenten der Phorbol-diester PMA (Phobol-12-Myristat 13-Acetat) eingesetzt. Die Stimulation der Sekretion läuft hierbei über eine weitere, mögliche Signalkaskade. PMA kann die PKC direkt aktivieren, was zu einer Ca<sup>2+</sup> unabhängigen Insulinsekretion führt [68]. Im Gegensatz zu Carbachol oder Acetylcholin wird nur der Weg über DAG, nicht aber über IP<sub>3</sub> stimuliert.

Vergleicht man einen oralen und einen intravenösen Glucosetoleranztest, so stellt man eine deutlich höhere Insulinsekretion bei oraler Glucosegabe fest. Diesen Unterschied bewirken intestinale Hormone, wie zum Beispiel GIP (gastric inhibitory peptide/glucose-dependent insulinotropic polypeptide), aus den K- Zellen oder GLP-1 (glucagon like peptide 1), aus den L- Zellen des Intestinums. Man spricht hierbei von der entero- insulinären Achse oder auch dem Inkretin- Effekt. Außer einer Steigerung der Insulinsekretion haben die Inkretine, die zur Glucagon- Familie zählen, auch noch andere positive Effekte auf die  $\beta$ - Zellen. So konnte gezeigt werden, dass GIP mitogen und anti- apoptotisch auf INS-1 Zellen wirkt [80]. Ebenso konnte für GLP-1 gezeigt werden, dass es in humanen Inseln den Zelltod hemmt, zu vermehrter Bcl-2 Expression führt, einen höheren Insulingehalt in den Inseln und eine bessere Insulinantwort auf Glucose verursacht und die Proliferation und Neogenese von  $\beta$ - Zellen fördert. Des Weiteren reduziert eine exogene Gabe beim Menschen die Nahrungsaufnahme, verlangsamt die Magenentleerung und vermindert die Glucagonsekretion [24]. Dies hat aktuell an therapeutischer Bedeutung gewonnen, da man stabile GLP-1 Analoga generieren konnte und diese nun als Antidiabetikum zur Verfügung stehen. Eine weitere Neuerung für die Diabetestherapie sind auch die DPP IV (Dipeptidyl Peptidase IV) Inhibitoren, die ebenfalls als Antidiabetikum auf den Markt gekommen sind. Die DPP IV ist die physiologische Proteinase, die endogenes GLP-1 abbaut. Durch ihr Hemmung ist es nun möglich, eine Akkumulation von endogenem GLP-1 zu erreichen

und dadurch die Insulinsekretion zu steigern. Hier ist im Gegensatz zu den GLP-1 Analoga, die subcutan appliziert werden müssen, sogar eine orale Gabe möglich. GLP-1 und GIP wirken über eine weitere, sehr häufig in Zellen vorkommende Signalkaskade, die in den 50er Jahren als erste überhaupt entdeckt wurde [70]. Sie binden an einen G- Protein gekoppelten Rezeptor, der daraufhin die Adenylatzyklase aktiviert, die ATP in zyklisches AMP (cAMP) umwandelt. cAMP seinerseits aktiviert die Proteinkinase A (PKA), die weitere Enzyme phosphoryliert und so das Signal weiterleitet.

Ein ähnlicher Weg der Adenylatzyklasenaktivierung wird durch Forskolin stimuliert. Allerdings führt Forskolin nicht über G- Protein Aktivierung, sondern direkt durch Bindung an die katalytische Untereinheit zu einer Stimulation der Adenylatzyklase. Um die direkte Aktivierung der Adenylatzyklase zu untersuchen wurden in diesen Studien Inseln mit Forskolin inkubiert.

Zusätzlich kennt man natürlich auch Hemmstoffe der Insulinsekretion. So reduzieren etwa Katecholamine über  $\alpha_2$  adrenerge Rezeptoren die Sekretion, indem sie die Adenylatzyklase hemmen und durch Hyperpolarisation der  $\beta$ - Zellen über die Aktivierung von Kaliumkanälen. Peterhoff und Mitarbeiter konnten zeigen, dass von den drei bekannten Formen des  $\alpha_2$  adrenergen Rezeptors,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  und  $\alpha_{2C}$ , nur der  $\alpha_{2A}$  und der  $\alpha_{2C}$  Rezeptor für die Hemmung der Insulinsekretion durch Adrenalin wichtig sind [64]. Den Mechanismus der Hyperpolarisation nutzen auch Galanin und Somatostatin [23]. Sie sind ebenfalls potente Hemmstoffe der Insulinausschüttung [84], [82]. Bekannterweise kann eine langfristige Glucokortikoid Therapie zum Steroid induzierten Diabetes führen. Es konnte gezeigt werden, dass auch Glucokortikoide die Insulinsekretion hemmen und zwar einerseits über vermehrte Adrenorezeptor Aktivierung [67] und über gesteigerte  $K_v$  Kanal Aktivität [85]. Allerdings führen Glucokortikoide nicht nur zu Sekretionsdefiziten sondern auch zur Apoptose von  $\beta$ - Zellen [67], indem sie die Phosphorylierung von IRS-2, PKB und ERK hemmen [5].

## 1.5 Regulation der Insulinsekretion durch Fettsäuren

Der Zusammenhang zwischen Fetten beziehungsweise Adipositas und Diabetes ist seit langem Gegenstand von Diskussionen. Etwa 80 % aller Diabetes Mellitus Typ 2 Patienten sind auch adipös [30]. Als Adipositas bezeichnet man jeden BMI ( Körpergewicht in kg/ (Körpergröße in m)<sup>2</sup>) über 30, wobei man innerhalb der



Diagnose nochmals in unterschiedliche Schweregrade unterteilt. Außerdem wird in 60 %- 70 % aller Diabeteserkrankungen auch eine Dyslipidämie und eine arterielle Hypertonie diagnostiziert [2]. Treten diese Erkrankungen zusammen auf spricht man vom Metabolischen Syndrom. Dabei muss kein manifester Typ 2 Diabetes diagnostiziert sein, alleine eine gestörte Glucosetoleranz zählt auch schon als Risikofaktor. Zu den oben genannten Erkrankungen werden außerdem auch die Mikroalbuminurie und die Hyperurikämie zur Diagnose, beziehungsweise als Bestandteile des Metabolischen Syndroms herangezogen. Die multifaktoriellen Stoffwechselstörungen des Metabolischen Syndroms sind die Hauptrisikofaktoren für mikro- und makrovasculäre Erkrankungen, wie zum Beispiel die koronare Herzkrankheit. Das Risiko an einer koronaren Herzkrankheit zu erkranken, steigt durch das Metabolische Syndrom um das 2-3fache. Das metabolische Syndrom ist eine typische Erkrankung der westlichen, industrialisierten Welt, was sich aber in Zukunft ändern wird. Denn auch in sogenannten Entwicklungsländern häuft sich die Erkrankung zunehmend [1].

Fette werden nach der Nahrungsaufnahme durch die Lipase des Pankreas in freie Fettsäuren und Glycerin zerteilt. Sie bilden mit den Gallensäuren als Emulgatoren, Micellen aus Fettsäuren, Phospholipiden, Cholesterin, fettlöslichen Vitaminen oder auch fettlöslichen Medikamenten. Im Jejunum zerfallen die Micellen und die Bestandteile werden von den Enterozyten resorbiert. In den Enterozyten werden die verschiedenen lipophilen Stoffe mit Apolipoprotein 48 zu Chylomikronen zusammen gebaut und in die Lymphe abgegeben. Die Abgabe an die Lymphe wird zur Umgehung der Leber genutzt, da bei Nahrungsaufnahme auch genügend Kohlenhydrate und Proteine vorhanden sind, die von der Leber zur Energiegewinnung genutzt werden können. Die Fette werden zuerst in die Peripherie gebracht, wo sie zum Beispiel direkt in den Adipozyten als Energiereserve gespeichert werden können. Das meiste Fett im Körper liegt als Triglycerid vor, da es sich hierbei um eine Speicherform des Fettes handelt [37].

Man unterscheidet bei Fetten außerdem zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Ungesättigt bedeutet, dass in der Kohlenstoffkette des Moleküls eine oder mehrerer Doppelbindungen vorliegen. Die ungesättigten Fette sind für den Körper teilweise essentiell, das heißt er kann sie nicht selbst produzieren sondern muss sie über die Nahrung aufnehmen. Zum Beispiel ist die zweifach ungesättigte Linolsäure solch eine essentielle Fettsäure.

Für Fettsäuren, vor allem für gesättigte Fettsäuren konnte inzwischen eine Lipotoxizität ähnlich der Glucotoxizität, nachgewiesen werden. Dies zeigt, von welcher Bedeutung diese beiden Bestandteile (Adipositas und Diabetes mellitus) des me-

tabolischen Syndroms sind. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass bei einem Überangebot an Fettsäuren und TAGs (Triglyceriden) diese auch in anderen Zellen als Adipozyten, zum Beispiel  $\beta$ - Zellen, angereichert werden. Dies führt zu Funktionsstörungen der  $\beta$ - Zellen oder sogar zur Lipoapoptose. [88]. Lagern sich in den  $\beta$ - Zellen oder auch in Myozyten vermehrt Fette ein, so führt dies letztendlich zur Entstehung von Diabetes beziehungsweise zur Insulinresistenz in der Muskulatur [87].

Eitel und Mitarbeiter konnten zeigen, dass in humanen Inseln gesättigte Fettsäuren, wie Palmitat und Stearat Apoptose in  $\beta$ - Zellen auslösen, wohingegen einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren keine Apoptose induzieren konnten. Das selbe konnte ebenfalls in RIN1046-38 Zellen nachgewiesen werden [26]. Dies zeigt die protektive und anti- apoptotische Wirkung, die ein- oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren zugeschrieben wird. Einen schützenden Effekt auf das  $\beta$ - Zell Überleben hat auch die Umwandlung von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren durch die Stearoyl- CoA- Desturase (SCD). Zellen, die gegenüber Palmitat induzierter Apoptose resistent sind produzieren vermehrt SCD [9]. Dieser Befund betont den protektiven Effekt ungesättigter Fettsäuren auf das Zellüberleben. Im Gegensatz zu den ungesättigten Fettsäuren wirkt Palmitat in BRIN- BD11 Zellen [91] und kardialen Myozyten [16] apoptotisch. Auch in humanen Inseln konnten Maedler und Mitarbeiter den durch Palmitat ausgelösten apoptotischen Effekt zeigen [54]. Nach Langzeitbehandlung mit Palmitat konnte ebenfalls eine reduzierte  $\beta$ - Zellfunktion sowie eine verminderte  $\beta$ - Zellproliferation nachgewiesen werden. Diese Effekte waren mit Ceramidbildung, DNA Fragmentierung, Freisetzung von Cytochrom C und Reduktion von Bcl-2 assoziiert, was auf einen Apoptoseweg über das Mitochondrium hinweist [54]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Inkubation in ungesättigten Fettsäuren die negativen, pro- apoptotischen, durch die gesättigten Fettsäuren ausgelösten Effekte verhindern konnte [54].

Des Weiteren können Hyperglykämie und Fettsäuren synergistisch, im Sinne einer Glucolipotoxizität, wirken. In INS-1 Zellen und humanen Inseln führte die Inkubation mit Glucose zusammen mit gesättigten Fettsäuren zu einer deutlichen Steigerung der Apoptoserate gegenüber der Inkubation mit nur einem Stimulanz, was zeigt, dass Fettsäuren besonders im Zusammenspiel mit hohen Glucosewerten toxisch wirken. Glucose zusammen mit ungesättigten Fettsäuren führte nicht zu einem verstärkten apoptotischen Effekt [27].

Physiologisch werden die Fettsäuren im Körper als Energielieferant durch den Abbau über die  $\beta$ - Oxidation genutzt. Aber sie können auch als Signalmoleküle fungieren. Zum einen können sie an intrazelluläre Rezeptoren wie die PPAR's

(Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor) binden, die dann die Transkription modulieren und zu einer besseren Insulinsensitivität führen können. Dies wird medikamentös durch die Glitazone zur Therapie des Typ 2 Diabetes genutzt [42]. Zum anderen können Fettsäuren aber auch an membranständige Rezeptoren, wie etwa die toll like Rezeptoren (TLR) oder GPR 40 binden. GPR 40 zählte lange zu den „orphan receptors“, bis entdeckt wurde, dass der Rezeptor mit sieben membrandurchspannenden Domänen als Andockstelle für freie Fettsäuren dient. Nun bezeichnet man ihn auch als FFAR1 (Free Fatty Acid Receptor 1) [8]. Er findet sich in der Plasmamembran der  $\beta$ - Zellen des Pankreas, wo er nach Kontakt mit einer langkettigen freien Fettsäure über G- Proteine eine PLC aktiviert und so über Freisetzung von  $IP_3$  und DAG die Insulinsekretion stimuliert [41]. Auf diese Weise können Fettsäuren die Insulinsekretion amplifizieren. Andererseits können Fettsäuren auch über ihren Abbau in der  $\beta$ - Oxidation die mitochondriale ATP Generierung stimulieren und somit über Hemmung von  $K_{ATP}$  Kanälen, die  $\beta$ - Zelle depolarisieren und die Insulinsekretion induzieren. Ein weiterer möglicher Weg zur Steigerung der Insulinsekretion ist, die Stimulation der anaplerotischen Reaktionen durch Glucose, Glutamin oder Leucin, die in der Nahrung enthalten sind. Dabei wird Citrat aus dem Mitochondrium freigesetzt und im Rahmen der Fettsäuresynthese entsteht Malonyl- CoA. Dieses führt zu einer Hemmung der  $\beta$ - Oxidation, wodurch langkettige Fettsäuren akkumulieren und direkt oder durch Umbau zu komplexen Fetten, wie DAG oder Phospholipiden, die Insulinsekretion stimulieren [60]. Diese zusätzliche Sekretionssteigerung hat vor allem dann große Bedeutung, wenn die  $\beta$ - Zellen eine vorliegende Insulinresistenz durch vermehrte Insulinsekretion überwinden müssen [60].

Die GPR40 abhängige Stimulation der Insulinsekretion wurde in dieser Arbeit untersucht, indem die isolierten Inseln zum einen mit den Fettsäuren Palmitat oder Oleat und zum anderen mit einem spezifischen Agonisten des GPR40 Rezeptors inkubiert wurden. Palmitat ist eine gesättigte Fettsäure mit 16 C-Atomen. Sie ist eine der am häufigsten im menschlichen Körper vorkommenden Fettsäuren, da bei der endogenen Fettsäuresynthese fast ausschließlich Palmitat entsteht [37]. Im Gegensatz dazu hat Oleat eine Doppelbindung in seinen 18 C-Atomen und gehört damit zu den einfach ungesättigten Fettsäuren.

## 1.6 Die Proteinkinase C

Die Proteinkinase C ist eine ubiquitär vorkommende Serin/ Threonin- Kinase, die an vielen wichtigen Zellzyklusprozessen beteiligt ist. Es konnte ihr Einfluss auf

die Proliferation und das Überleben der Zelle, sowie ihre Einfluss in der Apoptose gezeigt werden [69]. Sie wird mit Erkrankungen wie Myokardinfarkt und zerebralem Insult, sowie der Tumorprogression in Zusammenhang gebracht [44], [59]. Die Proteinkinase C wurde erstmals 1977, als Phospholipid-abhängige, durch Calcium aktivierbare Proteinkinase von Nishizuka und Mitarbeiter beschrieben [79]. Inzwischen weiss man, dass die PKC nicht ein einzelnes Enzym, sondern eine ganze Enzymfamilie ist. Diese besteht aus bis zu zwölf Isoformen [65]. Sie können nach Sequenzhomologien und je nach Aktivierungsmechanismus in drei Untergruppen, klassisch, neu und atypisch, eingeteilt werden. Zu den klassischen Isoformen (cPKC) gehören die PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$ , die Calcium-abhängig und durch DAG aktivierbar sind. Zu den neuen Isoformen (nPKC) zählt man die PKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  und  $\mu$ , die Calcium-unabhängig aber durch DAG aktivierbar sind. Und schließlich gehören zu den atypischen Isoformen (aPKC) die PKC  $\xi$  und  $\lambda$ , die Calcium-unabhängig und auch nicht durch DAG aktivierbar sind. [94]. Alle Isoformen bestehen aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit. Als Zeichen der Aktivierung wird bei allen Isoformen die Translokation vom Zytosol zur Membran gewertet [75]. Aber auch die Translokation zum Nucleus oder zu Elementen des Zytoskeletts, nach Aktivierung wurden beschrieben [58], [21]. Viele Zellen enthalten verschiedene Isoformen der PKC, die wiederum in verschiedenen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind. Es konnte aufgezeigt werden, dass jede Isoform der PKC an einen spezifischen, sogenannten RACK (Receptor for Activated C Kinase) bindet, der sie dann in die Nähe ihres Substrates bringt [57].

Die unterschiedlichen Aktivierungsmuster der Isoformen kommen dadurch zustande, dass DAG an die C1 Domäne und Ca<sup>2+</sup> an die C2 Domäne der PKC bindet. Bei der klassischen PKC findet man diese beiden Domänen und sowohl Calcium als auch DAG haben die Möglichkeit zu binden. Bei den neuen PKCs fehlt die C2 Domäne, weshalb sie nicht durch Calcium aktiviert werden können. Den atypischen Formen fehlt die C2 Domäne ebenfalls und die C1 Domäne ist so verändert, dass kein DAG mehr binden kann. Allen gemeinsam sind die stark konservierten C3 und C4 Domänen, sowie eine Pseudosubstratsequenz (PS), die zu einer Hemmung der Kinase führt, indem sie mit der katalytischen Region interagiert. Bei PKC  $\lambda$  handelt es sich nicht direkt um eine spezielle Isoform, sondern sie kommt nur in Mäusen vor und entspricht dort, der im Menschen vorkommenden PKC  $\iota$  [75].

### 1.6.1 Die Aktivierung atypischer PKCs

Die atypischen PKCs können, anstatt durch  $\text{Ca}^{2+}$  und DAG, über den IRS (Insulinrezeptorsubstrat)/ PI-3(Phosphoinositid- 3) Kinase Signalweg aktiviert werden, wodurch sie die Aufnahme von Glucose in Muskel und Fettgewebe vermitteln können. Dadurch ist es möglich, dass sie eine Rolle in der Entstehung der Insulinresistenz spielen. Der IRS/ PI-3 Kinase Signalweg beginnt nach der Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor. Der Insulinrezeptor hat Tyrosinkinaseaktivität und besteht aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ - Untereinheiten, wobei die  $\alpha$ - Einheiten extrazellulär liegen und das Insulin binden. Die  $\beta$ - Einheiten reichen bis ins Zytoplasma und haben eine autophosphorylierende Eigenschaft. Bindet Insulin an den Rezeptor, phosphoryliert die  $\beta$ - Untereinheit Tyrosinreste des Rezeptors und anschließend auch an weiteren Zielmolekülen [23]. Zu diesen gehört vor allem das Insulinrezeptorsubstrat IRS-1, welches dann weiter über PI-3 Kinase und Akt/PKB(Proteinkinase B) Aktivierung, das Signal fortleiten kann. IRS-1 kann aber auch über ras und MAP Kinase das Signal weiterleiten, auf diese Weise wird vor allem die mitogene Wirkung des Insulin vermittelt [37]. Die PI-3 Kinase kann als Reaktion auf Insulin aber auch, wie schon erwähnt, die atypischen PKCs aktivieren, die somit das Insulinsignal übertragen können und deshalb auch einen Teil der Signalkaskade in der Vermittlung der Insulinresistenz darstellen können. Farese und Mitarbeiter konnten dies an Hand reduzierter IRS/ PI-3 Kinase vermittelter aPKC Aktivität bei Insulinresistenz in der Muskulatur und dem Fettgewebe zeigen [29].

### 1.6.2 Die Rolle der Proteinkinase C bei der Insulinsekretion

Die  $\beta$ - Zellen exprimieren mindestens sechs Isoenzyme der PKC, wobei vor allem  $\text{PKC}\alpha$  und  $\text{PKC}\delta$  exprimiert werden. Aber auch  $\text{PKC}\beta\text{II}$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  und  $\iota$  finden sich in den Inseln [46], [12].

Auf Grund dessen wurde untersucht, ob eine der PKC Isoformen an der Glucose-induzierten Insulinsekretion beteiligt ist. In Inseln von Ratten konnte gezeigt werden, dass TPA zu einer deutlichen Phosphorylierung von Substraten der cPKC führt und dass die durch TPA stimulierte Insulinsekretion in  $\text{PKC}\alpha\text{KN}$  Mäusen gehemmt ist. Dahingegen führte Glucose zu einer geringen Phosphorylierung von cPKC Substraten und die Glucose- induzierte Insulinsekretion wurde in  $\text{PKC}\alpha\text{KN}$  Mäuse nicht reduziert. Daraus kann man schließen, dass  $\text{PKC}\alpha$  nur zu einem kleinen Teil zur Insulinsekretion nach Glucosestimulation beiträgt aber bei der durch TPA induzierten Insulinsekretion durchaus beteiligt ist [12]. Auch Yedovitz-

ky und Mitarbeiter konnten an Inseln aus Ratten zeigen, dass  $PKC\alpha$  in die Insulinfreisetzung involviert ist. Sie nutzten dafür die selektive Hemmung der jeweiligen Isoform der PKC durch kurze Sequenzen, die sie aus den Bindungsstelle der entsprechenden RACKs entschlüsselt haben [93]. Auch die Hemmung der cPKC durch selektive Inhibitoren (Gö 6976) zeigte, dass die Sekretionsantwort auf Phorbol ester komplett blockiert wurde, aber die Glucose-induzierte Insulinsekretion nur leicht reduziert wurde [95]. Dies deutet ebenfalls an, dass die klassischen PKCs nicht essentiell sind für die Glucose-induzierte Insulinsekretion, möglicherweise aber doch einen modulierenden Einfluss darauf haben könnten [75].

Eine Beteiligung der Isoform  $PKC\epsilon$  in der Insulinsekretion wird ebenfalls diskutiert [93]. Aber in  $PKC\epsilon$  knockout Mäusen konnte während eines Glucosetoleranztestes keine Unterschiede zu den WT Mäusen festgestellt werden [76]. Hennige und Mitarbeiter konnten in RIN 1046-38 Zellen mittels Überexpression von  $PKC\alpha$ ,  $\beta II$ ,  $\epsilon$  und  $PKC\zeta$  und Stimulierung mit Glucose keine Sekretionsunterschiede feststellen, was zeigt, dass anscheinend keine dieser Isoformen Einfluss auf die Glucose stimulierte Insulinsekretion hat [34].

Auch in der durch Fettsäuren ausgelösten Insulinsekretion wird die Beteiligung von PKCs untersucht, da man weiss, dass PKCs durch Fettsäuren aktiviert werden können [26]. Allerdings fehlen bisher eindeutige Nachweise [75].

Warwar und Mitarbeiter untersuchten an perfundierten Pankreata der GK-Ratte, einem Modell für den nicht-adipösen Typ 2 Diabetes und zur Kontrolle an Wistar Ratten, die Reaktion verschiedener PKC Isoenzyme auf Glucose [90]. Für  $PKC\alpha$  konnten sie eine räumliche Nähe zu den Insulingranula während der biphasischen Insulinsekretion feststellen und vermuten eine Funktion der Isoform in der Beförderung der Granula zur Exozytosestelle.  $PKC\epsilon$  könnte auf Grund seiner Bewegung in der Zelle während der Glucosestimulation zur Aktivierung der Granula für die Exozytose notwendig sein und  $PKC\zeta$  zeigte eine doppelte Funktion; einmal die Initiierung der Insulinsekretion und zusätzlich eine regulatorische Rolle in der Transkription. Der Vergleich zwischen der GK Ratte und der normoglykämischen Ratte zeigte zwar verminderte Aktivität beziehungsweise verminderte Expression von  $PKC\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$  in der GK Ratte, aber es konnte noch keine Kausalität zur Hyperglykämie der Ratte hergestellt werden [90]. Eine genaue Rolle für PKC Isoenzyme in der Glucose stimulierten Insulinsekretion zu definieren bleibt weiterhin schwierig, was zum Teil auch auf technische Probleme zurück zu führen ist. So werden zum einen in den  $\beta$ -Zellen, wie gesagt verschiedene Isoformen exprimiert und auch die Spezies mit denen die Experimente durchgeführt wer-

den, weisen Sekretionsunterschiede auf. So konnte in Studien gezeigt werden, dass zwischen Maus- und Ratteninseln durchaus deutliche Speziesunterschiede bezüglich der Insulinsekretion und der Reaktion auf PKC Inhibitoren bestehen [95].

### 1.6.3 Die Rolle der Proteinkinase C bei der Insulinresistenz

Des Weiteren wurde untersucht, ob und in wie weit, die Isoformen der PKC Einfluss auf die Insulinresistenz der Peripherie haben. Laybutt und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Ratten, denen über 1 oder über 4 Tage chronisch Glucose infundiert wurde, vermehrt langkettiges Acyl-CoA und vermehrt Malonyl- CoA in ihrer Muskulatur aufweisen. Zusätzlich war die PKC $\epsilon$  im Sinne einer chronischen Aktivierung vermehrt in der Membran zu finden. Dies zeigt, dass chronische hohe Glucosespiegel zur Einlagerung von Fett in die Muskulatur führen und zusätzlich die  $\beta$ -Oxidation über Malonyl- CoA gehemmt wird. Dies kann in der Entstehung von Insulinresistenz in der Muskulatur eine Rolle spielen und scheint durch PKC $\epsilon$  vermittelt zu werden [50]. Ebenfalls konnte in HFD (High Fat Diet) gefütterten Ratten eine gesteigerte Aktivität von PKC $\epsilon$  und auch PKC $\theta$ , sowie eine vermehrte Fetteinlagerung in die Zellen nachgewiesen werden [74]. Die Insulinresistenz der Leber wird, wie es scheint, auch durch PKC $\epsilon$  vermittelt. In Leberbiopsien von adipösen Diabetikern konnte eine dreifache Aktivitätssteigerung der PKC $\epsilon$  gezeigt werden, die interessanter Weise in adipösen Gesunden nicht nachweisbar war [15]. Auch im entsprechenden Tiermodell, der Zucker Ratte, konnten diese Ergebnisse reproduziert werden [15].

Über welche Signalwege intrazellulär, PKC zur Insulinresistenz beiträgt ist noch nicht vollständig geklärt. Paz und Mitarbeiter beschrieben, eine vermehrte Serin/ Threonin Phosphorylierung von IRS-1 und auch IRS-2. Dies soll die Bindung der Substrate an den Insulinrezeptor hemmen, wodurch die Tyrosin Phosphorylierung von IRS-1 und -2 verhindert wird. Diese ist aber normalerweise notwendig um das Insulinsignal regelrecht weiter zu leiten. Sie zeigen somit ein molekulares Modell der Insulinresistenz [63]. Da auch gezeigt werden konnte, dass PKC Isoenzyme in der Lage sind IRS-1 an Serin zu phosphorylieren, ist dies eine der Möglichkeiten, wie die PKC zur Insulinresistenz beitragen kann. Es konnte für PKC $\alpha$ ,  $\beta$ II,  $\delta$  und  $\theta$  gezeigt werden, dass sie IRS-1 Serin phosphorylieren können [43], was zu einer reduzierten PI-3 Kinase/Akt Aktivierung und letztendlich zu einem verminderten Insulinsignal und IRS-1 Abbau führt [75].

#### 1.6.4 Die Proteinkinase C in transgenen Mausmodellen

Transgene Mäuse werden zunehmend genutzt um die Rolle von PKC Isoenzymen zu untersuchen. Dabei unterscheidet man klassische transgene Tiere, denen zusätzliche DNA in ihr Genom inseriert wurde, um die Expression des entsprechenden Protein zu erreichen, von sogenannten knockout Tieren. Bei diesen wird durch gezielte Insertion von veränderter DNA in ihr Genom, die Expression des entsprechenden Protein verhindert.

Da PKC $\theta$  in der Muskulatur stark exprimiert wird, wurde immer wieder vermutet, dass sie in der Glucosehomöostase ein Rolle spielen könnte. Es wurde an PKC $\theta$  knockout Mäuse fest gestellt, dass sie einerseits gegenüber kurzfristiger Insulinresistenz in der Muskulatur und fehlerhafte Insulinsignalvermittlung geschützt sind. Aber Langzeitstudien zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für Adipositas und durch Diät induzierte Insulinresistenz in den PKC $\theta$  knockout Mäusen [75].

Auch in PKC $\epsilon$  knockout Mäusen wurde die  $\beta$ - Zellfunktion und die Insulinwirkung untersucht. So konnte in diesen Mäusen eine verstärkte Insulinsekretion gezeigt werden, die einer durch HFD induzierten Glucoseintoleranz entgegen wirkte. Zusätzlich wurde die Insulinverfügbarkeit durch reduzierte Insulinclearance und verminderte Insulinaufnahme in der Leber verbessert. Sogar in prädiabetischen Mausmodellen wurde durch die Deletion der PKC $\epsilon$  eine verbesserte Glucosetoleranz und Insulinverfügbarkeit erreicht [75]. Außerdem konnte eine Optimierung der über Glucose regulierten Fettstoffwechselung festgestellt werden, was wiederum die Insulinsekretion steigert. Denn die Wiederherstellung der Balance zwischen Veresterung von Fetten und  $\beta$ - Oxidation könnte zur Normalisierung der Insulinsekretion beitragen [76]. Des Weiteren steigt durch das Fehlen von PKC $\epsilon$  vor allem die, bei Diabetikern verminderte, erste Phase der Insulinsekretion an [75]. Dies könnte in Zukunft von Bedeutung sein, da die Hemmung von PKC $\epsilon$  am ursprünglichen Problem der verminderten Insulinsekretion ansetzt ,wogegen andere therapeutische Optionen, die die Insulinsekretion steigern eher das eigentliche Problem zu umgehen und zu überwinden versuchen [75].

#### 1.6.5 Die Rolle der Proteinkinase C in der Regulation der $\beta$ -Zellmasse und -differenzierung

Letztendlich kann man noch den Einfluss von PKC Isoenzymen hinsichtlich der  $\beta$ -Zellmasse beziehungsweise Differenzierung untersuchen. Dabei konnte für PKC $\zeta$  eine positive Wirkung auf die  $\beta$ - Zellproliferation gezeigt werden. In RIN 1046-38 Zellen führte eine Überexpression von PKC $\zeta$  zu einer erhöhten basalen sowie zu



einer gesteigerten, durch IGF-1 stimulierten [(3)H]Thymidin Aufnahme, was durch Hemmung der MAP Kinase verhindert wurde. Dies deutet auf eine mitogene Rolle für PKC $\zeta$  hin. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass gezeigt werden konnte, dass in den PKC $\zeta$  überexprimierenden Zellen der Transkriptionsfaktor PDX-1 durch IGF-1 aktiviert wurde [34]. Auch die Wirkung von nPKC Isoformen in der Regulation von  $\beta$ - Zellmasse und Proliferation wird diskutiert. In den PKC $\epsilon$  knockout Mäusen konnte aber keine Veränderung der  $\beta$ - Zellemasse nachgewiesen werden [76]. Die Rolle der nPKC Isoform PKC $\delta$  wird unter 1.7 ausführlich diskutiert.

### 1.6.6 Weitere Funktionen der Proteinkinase C

Auch unabhängig von der Rolle der PKC Isoformen in der  $\beta$ - Zellfunktion und dem Erhalt der  $\beta$ - Zellmasse sowie der Insulinresistenz wurden weitere Funktionen bei verschiedenen Zellen nachgewiesen. So ist zum Beispiel die PKC auch in die Kontrolle der Exozytose von Neurotransmittern und dadurch ebenfalls an der synaptischen Plastizität beteiligt. Durch PMA stimuliert, kommt es zur PKC abhängigen Phosphorylierung von Munc-18, einem Protein, dass an Syntaxin bindet. Durch die Phosphorylierung von Munc-18 an Ser-313, wird Syntaxin frei und kann sich in den SNARE Komplex einfügen, wodurch es zur Exozytose von Neurotransmittern kommt [6]. Ähnliches konnte Uchida und Mitarbeiter auch in  $\beta$ - Zellen zeigen. In Inseln aus PKC $\delta$   $-/-$  Mäusen war die Phosphorylierung von Munc-18 reduziert, was mit einer reduzierten Insulinsekretion korrelierte [81]. Des Weiteren konnte für die cPKCs auch eine Beteiligung an der Hemmung von Calcineurin in mononuklären Zellen im Blut gezeigt werden. Durch PMA stimuliert phosphorylieren cPKCs Cabin-1, einem Inhibitor von Calcineurin [77].

## 1.7 Die PKC $\delta$

Die Proteinkinase C $\delta$  gehört zu den neuen Isoformen der PKC und wird zur großen Gruppe der AGC Kinasen gezählt. Unter diesen fällt sie auf, da sie nicht auf die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife angewiesen ist um katalytisch aktiv zu werden [72]. Sie wurde erstmals durch Gschwendt und Mitarbeiter 1986 in Mausepidermis beschrieben [33]. Sie konnte unter anderem in Ratte, Maus und im Menschen nachgewiesen werden, wo die Kinase jeweils aus 673, 674 beziehungsweise 676 Aminosäuren besteht. Die Aminosäurekette ist sehr homolog in diesen Spezies und hat in allen ein kalkuliertes Molekulargewicht von 77,5 kDa

[94]. PKC $\delta$  wird in vielen verschiedenen Zellen und Geweben exprimiert [94].

### 1.7.1 Die Struktur der Isoform PKC $\delta$

PKC $\delta$  zählt zu den neuen Isoformen, da sie nur durch DAG aber nicht durch Calcium aktivierbar ist, weil ihr die Ca<sup>2+</sup> bindende C2 Domäne fehlt. Wie in Abbildung

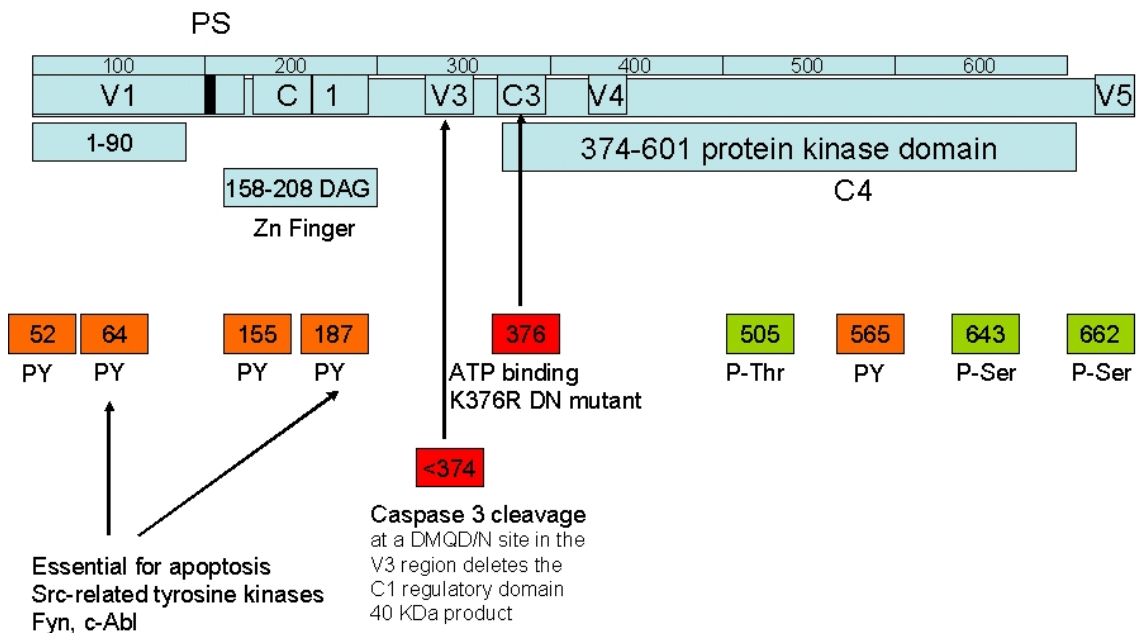


Abbildung 1.1: **Schema der PKC $\delta$** ; von R. Lehmann, Med. Klinik IV, Tübingen; V1- V5= variable Regionen; C1, C3, C4 = konstante Regionen; PS = Pseudosubstrat.

1.1 zu sehen ist, kann man innerhalb der Kinase variable Regionen (V1, V3, V4, V5) von konstanten (C1, C3, C4) Regionen unterscheiden. An die C1 Domäne, die zwei cysteinreiche Zinkfinger Sequenzen enthält, bindet DAG um die Kinase zu aktivieren. Des Weiteren findet sich in PKC $\delta$  eine ATP bindende C3 Region und eine katalytisch aktive C4 Domäne, die das Substrat bindet. Wie alle Isoformen hat sie eine Pseudosubstratsequenz (PS) in der variablen Region V1, die im inaktiven Zustand mit der katalytischen Domäne interagiert. Erst durch entsprechende Aktivierung der Kinase kommt es zu Konformationsänderungen und die Pseudosubstratsequenz (PS) gibt den katalytischen Anteil frei [75]. In der V3 Region befindet sich die Stelle, an der Caspase 3 das Protein in eine 38 kDa große, N-terminale regulatorische und eine 40 kDa große, C-terminale katalytische Untereinheit zerschneiden kann [94]. De Vries und Mitarbeiter konnten zeigen, dass PKC $\delta$  eine "Nuclear Localization Site" im C-terminalen Ende besitzt, die für die

Anreicherung im Kern notwendig ist [19].

### 1.7.2 Die Aktivierung der PKC $\delta$

PKC $\delta$  kann zum einen durch Tyrosin Phosphorylierung und zum anderen über Caspase 3 abhängige proteolytische Spaltung aktiviert werden. Weiterhin findet man auch eine Phosphorylierung von Serin/ Threonin Resten in PKC $\delta$ , die aber nicht zur vollen Aktivierung ausreicht, sondern PKC $\delta$  wohl eher auf die Aktivierung durch DAG vorbereiten. Vor allem eine Phosphorylierung an Serin 643 und Threonin 505 in der Aktivierungsschleife konnte bei einer Aktivierung und Translokation zur Membran der PKC $\delta$  gezeigt werden [55]. Bei dieser Phosphorylierung scheint PKC $\epsilon$  eine Rolle zu spielen, da eine Überexpression von PKC $\epsilon$  zu einer vermehrten Threonin Phosphorylierung der PKC $\delta$  führt [72].

Die Tyrosin Phosphorylierung verändert die Aktivität der PKC $\delta$  [55] und kann einerseits zur Aktivierung andererseits zur Hemmung der PKC $\delta$  führen. So konnte in Keratinozyten gezeigt werden, dass die Tyrosin Phosphorylierung nach EGFR Stimulierung zu einer Hemmung der PKC $\delta$  führt [17]. Li und Mitarbeiter konnten in Monozyten aber eine Stimulation der PKC $\delta$  zeigen [52]. Diese Unterschiede können einerseits auf die unterschiedlichen Stimuli in verschiedenen Zellen zurückgeführt werden. Andererseits ist es möglich, dass die Phosphorylierung von Tyrosinresten an unterschiedlichen Positionen auch gegensätzliche Wirkung zeigt oder die Phosphorylierung einer Position wiederum die Phosphorylierung an anderer Stelle verhindert [94]. Eine solche Modulation könnte die vielfältigen Rollen der PKC $\delta$  in verschiedenen Zellen erklären [94]. Zu den Tyrosinkinase, für welche Phosphorylierungsstellen auf PKC $\delta$  nachgewiesen wurden, gehören Src, Lyn und c- Abl. So gibt es zum einen Hinweise, dass in kardialen Myozyten nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Exposition, Src PKC $\delta$  an den Tyrosinresten 311 und 332 phosphoryliert [73]. Aber auch c-Abl und Lyn konnten mit der Phosphorylierung von PKC $\delta$  in Verbindung gebracht werden [94], [69]. Als Zeichen der Aktivierung wird bei PKC $\delta$  wie auch bei den anderen Isoformen die Translokation der Kinase zur Membran gewertet [48].

Nach Exposition gegenüber verschiedenen Stimuli kommt es zur Aktivierung von PKC $\delta$  durch proteolytische Spaltung durch die Caspase 3. Erst 1995 konnte Emoto und Mitarbeiter diesen Weg der Aktivierung erstmals nach radioaktiver Bestrahlung von dendritischen Zellen zeigen [28]. Auch nachdem ein apoptotisches Signal eine Zelle erreicht hat, wandern die PKC $\delta$  und die Caspase 3 in den Kern,

wo PKC $\delta$  durch die Caspase gespalten wird. Durch die Spaltung entsteht das katalytisch aktive Fragment  $\delta$ CF [69].

Die Aktivierung durch Tyrosin Phosphorylierung oder durch proteolytische Spaltung durch Caspase 3 sind allerdings nicht als getrennte Schritte zu verstehen, sondern sind teilweise aufeinander angewiesen. Zum Teil kommt es zuerst zu einer Phosphorylierung von PKC $\delta$  bevor diese dann proteolytisch gespalten wird. So konnte in C6 Gliomzellen eine Aktivierung der PKC $\delta$  durch Phosphorylierung an Tyrosinresten nachgewiesen werden. Die Behandlung der Zellen mit Etoposid führte zu Phosphorylierung von vor allem Tyrosin 64 und 187, welche sich beide in der regulatorischen Untereinheit befinden. Nach der Phosphorylierung wanderte die Kinase in den Kern, wo sie durch Caspase 3 proteolytisch gespalten wurde und die Apoptose einleitete. Durch Überexpression von PKC $\delta$  konnte der proapoptotische Effekt noch verstärkt werden, durch Rottlerin, einen PKC $\delta$  Inhibitor und durch eine Kinase negative Mutante wurde die Apoptoserate reduziert. Auch durch die Mutation von fünf Tyrosinresten zu Phenylalanin konnte die Apoptoserate gesenkt werden, was zeigt, dass die Tyrosin Phosphorylierung von PKC $\delta$  eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielt [7]. Ähnliches konnten auch Humphries und Mitarbeiter zeigen. Sie identifizierten Tyrosin 64 und 155, ebenfalls in der regulatorischen Untereinheit der PKC $\delta$ , in Epithelzellen der Speicheldrüse, als essentielle Orte der Tyrosin Phosphorylierung für den Transport von PKC $\delta$  in den Kern. Ebenfalls eine Mutation von Tyrosin zu Phenylalanin an Position 64 und 155 der PKC $\delta$  führte zu einer verminderten apoptotischen Wirkung. Wurden die mutierten Proteine allerdings durch Anhängung einer NLS gezwungen im Kern zu akkumulieren, so war die Fähigkeit zur Apoptose wieder hergestellt. Dies bedeutet, dass die Phosphorylierung von Tyrosinresten nicht per se für die Apoptose notwendig ist, sondern den Weg von PKC $\delta$  in den Kern vermittelt [40].

### **1.7.3 Die pro- apoptotische Wirkung von PKC $\delta$**

Um die apoptotische Wirkung von PKC $\delta$  genauer zu untersuchen und die exakte Wirkungsweise zu klären wurden viele Studien unternommen. Reyland und Mitarbeiter zeigten, dass, nachdem ein apoptotisches Signal eine Zelle erreicht hat, die PKC $\delta$  und die Caspase 3 in den Kern wandern. Dort wird PKC $\delta$  durch die Caspase gespalten. Durch die Spaltung entsteht das katalytisch aktive Fragment  $\delta$ CF und die Zelle unterliegt der Apoptose.  $\delta$ CF scheint für die Ausführung der Apoptose wichtig zu sein, denn es ist nur in Zellen zu finden die apoptotisch sind.[69].

Eitel und Mitarbeiter konnten in RIN1046-38 Zellen ebenfalls zeigen, dass die durch gesättigte Fettsäuren ausgelöste Apoptose von einer Translokation von PKC $\delta$  in den Kern begleitet war. Dieses Phänomen konnte durch Expression einer dominant-negativen Mutante der PKC $\delta$  unterbunden werden. Als Zeichen der Apoptose konnte im Kern ein Lamin B1 Abbau festgestellt werden [26]. Dass PKC $\delta$  auch Einfluss auf die durch IL-1 $\beta$  in INS-1 Zellen ausgelöste Apoptose hat, zeigten Carpenter und Mitarbeiter. IL-1 $\beta$  führt in  $\beta$ -Zellen zur NO Synthetisierung, was als eine der Ursachen für  $\beta$ -Zelldysfunktion und Apoptose gilt. In einer PKC $\delta$ KN Mutante war die NO Produktion deutlich reduziert und auch die durch IL-1 $\beta$  induzierte Apoptose konnte komplett verhindert werden. Gleiches konnte für die Apoptose nach Steptozotoxin gezeigt werden [10], [11]. Carpenter und Mitarbeiter konnten hier erstmals zeigen, dass PKC $\delta$  eine spezifische und wichtige Rolle in der Vermittlung von Apoptose in  $\beta$ -Zellen spielt [11]. Des Weiteren konnte in Zellen der Speicheldrüse gezeigt werden, dass nach Etoposid Behandlung PKC $\delta$  in den Kern wandert und dann dort durch Caspase 3 gespalten wird. Dass PKC $\delta$  nur im Kern durch Caspase 3 geschnitten wird konnte ebenfalls nachgewiesen werden, da eine Mutante, die nicht im Kern akkumuliert nicht geschnitten wurde. Ebenso konnte gezeigt werden, dass für nicht gespaltene PKC $\delta$  die Zellen einen, vom Exportrezeptor Crm-1 abhängigen Weg kennen, PKC $\delta$  wieder aus dem Kern zu exportieren [20].

Kinase negative PKC $\delta$  wandert nicht in den Kern und kann Apoptose sogar verhindern, da sie endogene PKC $\delta$  daran hindert in den Kern zu gelangen [20]. Entsprechende Ergebnisse konnten auch in Epithelzellen der Speicheldrüse durch verschiedene Toxine gezeigt werden. Dort führte die Inkubation der Zellen mit entweder Etoposid einem Chemotherapeutikum, das die Topoisomerase II hemmt, Brefeldin A, einem Antibiotikum, Paclitaxel, einem Taxan, das die Mitose stört oder die Exposition gegenüber UV-Strahlung zur Apoptose, was in einer PKC $\delta$ KN Mutante verhindert wurde [56]. Auch in kardialen Myozyten, die durch Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apoptotisch werden, kann eine regulierende Rolle für PKC $\delta$  in der Apoptose vermutet werden [14]. Des Weiteren konnte in Brustkrebszellen eine PKC $\delta$  abhängige Apoptosesteigerung nach UV-Exposition nachgewiesen werden, was in Zusammenhang mit einer Ceramiderhöhung stand und durch Rottlerin oder siRNA gehemmt wurde [96]. Und ebenfalls war es in HeLa Zellen möglich die apoptotische Wirkung von PKC $\delta$  nach Exposition gegenüber Etoposid zu zeigen [18]. Bei der experimentellen Hemmung der PKC $\delta$  mit Rottlerin ist es wichtig zu bedenken, dass die spezifische Hemmung der PKC $\delta$  durch Rottlerin immer wieder in Frage gestellt oder verneint wurde [12], [91]. Allerdings konnte oft durch

Kinase negative Mutanten oder siRNA die Ergebnisse mit Rottlerin bestätigt werden [96].

Für den Transport von PKC $\delta$  in den Kern konnten Kheifets und Mitarbeiter zeigen, dass es sich keinesfalls um bloße Diffusion handelt, sondern, dass Annexin V dabei eine Rolle spielt. Nach der Aktivierung von PKC $\delta$ , aber vor der Translokation in den Kern, kommt es zu einer vorübergehenden Interaktion zwischen Annexin V und PKC $\delta$  und die Hemmung von Annexin V durch siRNA verhindert den Transport in den Kern [44].

Im Gegensatz zur nuklären Akkumulation gibt es auch Hinweise, dass PKC $\delta$  nach Aktivierung zum Mitochondrium wandert, wo es sowohl in normalen als auch neoplastischen Keratinozyten durch TPA Stimulation zur Apoptose der Zellen beiträgt [51].

#### **1.7.4 PKC $\delta$ aktiviert den intrinsischen Apoptoseweg**

Über den Weg des Mitochondriums aktiviert PKC $\delta$  den sogenannten intrinsischen Apoptoseweg. Dabei kommt es durch verschiedene Chemikalien, Medikamente, Strahlung und Stress- Einwirkung auf die Zelle zu einem Verlust des Membranpotential im Mitochondrium, zur Cytochrom C Freisetzung und zur Caspase 9 Aktivierung. Die Cytochrom C Freisetzung kann durch Bcl-2 gehemmt und durch Bax gefördert werden [62]. Im Gegensatz dazu unterscheidet man den extrinsischen Apoptoseweg, der nach Bindung eines entsprechenden Liganden an einen sogenannten Todesrezeptor, wie etwa die TNF $\alpha$ /FAS Rezeptorfamilie, zur Caspase 8 Aktivierung führt [56]. Es konnte gezeigt werden, dass die Kinase negative Mutation der PKC $\delta$  einen Verlust des mitochondrialen Membranpotential verhindert und die Aktivität der Caspase 9 hemmt [56]. Auch in Keratinozyten konnte eine Änderung des mitochondrialen Membranpotentials durch PKC $\delta$  nachgewiesen werden, was darauf hin deutet, dass die PKC $\delta$  direkt mit dem Mitochondrium interagiert [51]. Des Weiteren konnte in Brustkrebszellen nach UV- Bestrahlung eine PKC $\delta$  abhängige vermehrte Cytochrom C Freisetzung nachgewiesen werden [96]. Genauso gibt es in dopaminergen Neuronen Hinweise auf eine mitochondriale Apoptose durch PKC $\delta$ . Denn dort kam es nach Mangan Exposition ebenfalls zu Cytochrom C Freisetzung und Caspase 3 Aktivierung, die daraufhin PKC $\delta$  aktivierte. Caspase 8 Aktivität konnte hingegen nicht nachgewiesen werden [49].

Wie genau PKC $\delta$  zur Apoptose führt, welche anderen Enzyme aktiviert werden

und wie die Signalkaskade verläuft ist bisher noch unklar. Yamaguchi und Mitarbeiter konnten zeigen, dass unter ROS Einfluss sowohl PKC $\delta$  als auch IKK $\alpha$  in den Kern wandern, wo IKK $\alpha$  durch PKC $\delta$  aktiviert wird. Dies führt dann zu Aktivierung des Tumorsuppressors p53 [92]. Außerdem wird die MAP Kinase Familie mit der Vermittlung des Apoptosesignals in Verbindung gebracht. Denn es konnte zum Beispiel bei PMA abhängiger Apoptose eine Aktivierung von JNK und eine Inaktivierung von Erk gezeigt werden. Des Weiteren scheint auch NF $\kappa$ B in der Signalvermittlung eine Rolle zu spielen [94].

Die größte Gruppe der PKC $\delta$  Substrate stellen nukleäre Proteine dar. Zu diesen zählen unter anderem Lamin B, Rad9 und die DNA Proteinkinase. Aber auch die Transkription von sogenannten Todesgenen kann durch PKC $\delta$  über Aktivierung oder Hemmung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren, wie p53, p73 und STAT1 reguliert werden [69]. DeVries und Mitarbeiter konnten zum Beispiel zeigen, dass STAT1 zur Induktion von Apoptose in Zellen nach Behandlung mit Etoposid notwendig ist [18].

### 1.7.5 Weitere Funktionen der PKC $\delta$

Im Gegensatz zum bisher gesagten gibt es auch Hinweise, dass PKC $\delta$  nicht in die Apoptoseeinleitung verwickelt ist. So konnte in BRIN-BD11 Zellen für PKC $\delta$  kein Einfluss in der durch Palmitat ausgelösten Apoptose festgestellt werden, da die Runterregulierung von PKC $\delta$  durch langanhaltende PMA Behandlung nicht vor der durch Palmitat induzierten Apoptose schützte [91]. Sogar protektive Wirkung auf das Zellüberleben scheint PKC $\delta$  in verschiedenen Zellen zu vermitteln. So konnten Liu und Mitarbeiter in Mäuseembryonalen Fibroblasten zeigen, dass PKC $\delta$  Ebp1 (ErbB3- binding Protein), welches DNA Fragmentierung verhindert, phosphoryliert. Dadurch wird Ebp1 vor dem Abbau geschützt und der apoptotische Zelltod wird verhindert [53]. Des Weiteren konnte für PKC $\delta$  auch in HeLA Zellen eine protektive Funktion bei der Reaktion auf oxidativen Stress nachgewiesen werden [22].

PKC $\delta$  ist auch an der Regulation von Zell- Zell Kontakten und der Zellmigration beteiligt [61]. Dies ist auch für die Insulinsekretion von Bedeutung, da für die regelrechte Insulinproduktion und -speicherung, ebenfalls intakte Zell- Zell Kontakte notwendig sind. Fehlen diese, kommt es zu einer gestörten Insulinsekretion [89]. Interessanter Weise wird PKC $\delta$  auch in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra stark exprimiert. Dort kann sie die Tyrosin Hydroxylase phosphorylieren und deren Aktivität dadurch hemmen. Dies führt zu einer verminderten

Dopaminsynthese. In der Tat wurde in PKC $\delta$  knockout Mäusen eine erhöhte Dopaminkonzentration nachgewiesen. Dies spielt möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung von Morbus Parkinson [98], [97]. Mangan provoziert eine neurologische Erkrankung die dem Morbus Parkinson sehr ähnlich ist und in dopaminergen Neuronen wurde gezeigt, dass die PKC $\delta$  eine Rolle in der durch Mangan induzierte Apoptose spielt. Auch hier konnte eine PKC $\delta$  Aktivierung durch Caspase 3 abhängige Spaltung nachgewiesen werden. Durch Hemmung der Caspase 3 mit Z-DEVD-FMK, einem spezifischen Caspase 3 Inhibitor, konnte die Spaltung von PKC $\delta$  komplett verhindert werden [49].

Einen Einfluss auf die Tumorprogression konnte für PKC $\delta$  im Hepatozellulären Karzinom gezeigt werden. Durch die Aktivierung von PKC $\delta$  kommt es zur Phosphorylierung von HSP27 über p38/MAP Kinase. Dies korreliert mit der Tumorprogression des Karzinoms [78].

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass PKC $\delta$  für die Differenzierung von Monozyten von großer Wichtigkeit ist [52].

### **1.7.6 Die Rolle der PKC $\delta$ bei der Insulinresistenz**

Bei der Vermittlung von Insulinresistenz scheint PKC $\delta$  ebenfalls eine Rolle zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass als Reaktion auf Leptin IRS-1 an Serin 318 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung reduziert das Insulinsignal in den Zellen und für diese Phosphorylierung ist neben Jak-2 und IRS-2 auch PKC $\delta$  verantwortlich. [36]. Auch Greene und Mitarbeiter konnten eine Interaktion zwischen PKC $\delta$  und IRS-1 nachweisen. So führte eine PKC $\delta$  Aktivierung zu einer verminderten IRS-1 Tyrosin Phosphorylierung, was durch vermehrte Serin/ Threonin Phosphorylierung von IRS-1 direkt durch PKC $\delta$  verursacht wird. Da PKC $\delta$  direkt durch Fettsäuren aktiviert wird, ist dies auch ein möglicher Weg der Entstehung der Insulinresistenz. Denn hier wird speziell durch die Phosphorylierung von Serin 307, Serin 323 und Serin 574 die Weiterleitung des Insulinsignals verhindert [32].

Interessanter Weise konnte in L6 Muskelzellen eine nukleäre Anreicherung von PKC $\delta$  als Reaktion auf Insulin gezeigt werden, die bei Exposition gegenüber anderen Wachstumsfaktoren oder Rosiglitazine nicht nachweisbar war [38].



### 1.7.7 Die Rolle der PKC $\delta$ in der $\beta$ - Zelle

Die Beteiligung der PKC $\delta$  an der PKC- abhängigen Stimulation der Insulinsekretion ist nicht vollständig geklärt. Carpenter und Mitarbeiter stellten fest, dass sowohl die Überexpression von PKC $\delta$  als auch die Kinase negative Mutation in  $\beta$ - Zellen aus Ratten, keinen Einfluss auf die Glucose- induzierte Insulinsekretion hat [12]. Entgegen dieser Ergebnisse konnten Uchida und Mitarbeiter zeigen, dass PKC $\delta$  in Mausinseln durchaus die Insulinsekretion potenziert. Denn PKC $\delta$ -/- Mäuse mit C57BL/6J Hintergrund entwickelten im Alter eine gestörte Glucosetoleranz mit reduzierter Insulinsekretion. Die Insulinsensitivität der Mäuse war dagegen nicht verändert [81]. Die Stimulation isolierter Inseln mit KCl und Arginin führte nicht, wie erwartet, zu einer Sekretionssteigerung. Die Immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchung der PKC $\delta$  -/- Mäuse zeigte aber eine vermehrte Ansammlung von Insulingranula entlang der Plasmamembran bei gleichzeitig verminderter Phosphorylierung von Munc-18. Dies kann für eine direkte Hemmung der Exozytose sprechen. Die Inselmorphologie und die gesamte Inselmasse waren unverändert, was auch für den Insulingehalt isolierter Inseln gilt [81]. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Arbeitsgruppen kann einerseits auf Speziesdifferenzen zwischen Ratten und Mäusen zurückgeführt werden. Andererseits auf den Unterschied zwischen PKC $\delta$  knockout und Kinase negativer PKC $\delta$  zurückgeführt werden. Durch die komplette Deletion von PKC $\delta$  kann es zu anderweitigen Funktionsstörungen kommen, wie zum Beispiel einer gestörten Entwicklung der  $\beta$ - Zellen und dadurch auch zu einer Verfälschung der Ergebnisse. Bei der Nutzung einer Kinase negativen Mutation ist es dahingegen möglich, dass die endogene PKC $\delta$  nicht vollständig supprimiert wird und es dadurch zu Artefakten in den Ergebnissen kommt [81].

### 1.7.8 Zusammenfassung der Rolle und Funktion der PKC $\delta$

Die 1986 erstmals beschriebene Proteinkinase C $\delta$  zählt zu den neuen Isoformen der PKC und ist damit nur durch DAG aber nicht durch Calcium zu aktivieren. Ihre Aktivität kann über Serin/ Threonin Phosphorylierung moduliert werden und sie ist einerseits durch Tyrosinphosphorylierung durch Lyn, c-Abl und Src, andererseits über Caspase 3 abhängige Spaltung aktivierbar. Es gibt viele Hinweise auf die pro- apoptotische Wirkung der PKC $\delta$  [69], [26], [11]. Dabei wandert PKC $\delta$  als Reaktion auf ein apoptotisches Signal in den Zellkern, wo sie durch Caspase 3 in ein katalytisch aktives Fragment  $\delta$ CF gespalten wird.  $\delta$ CF ist für die Apoptose notwendig [69]. Reagenzien, die PKC $\delta$  abhängige Apoptose auslösen sind un-

ter anderem Fettsäuren [26], Etoposid [20], Brefeldin A, Paclitaxel, UV- Strahlung [56] und  $H_2O_2$  [14].  $PKC\delta$  aktiviert den intrinsischen Apoptoseweg über das Mitochondrium, was ebenfalls mehrfach gezeigt wurde [51],[96], [49]. Des Weiteren gibt es mehrere Hinweise darauf, dass  $PKC\delta$  die periphere Insulinresistenz induziert [36], [32].

Die Rolle der  $PKC\delta$  bei der Insulinsekretion bleibt weiter unklar, da es divergierende Ergebnisse gibt. So wurde sowohl gezeigt, dass  $PKC\delta$  keinen Einfluss auf die Glucose- induzierte Insulinsekretion hat [12], als auch dass  $PKC\delta$  die Glucose- induzierte Insulinsekretion potenziert [81].

## 1.8 Ziel der Arbeit

In dieser Studie wurde untersucht, welche Rolle die  $PKC\delta$  in insulinsezernierenden Zellen spielt. In einem ersten Teil wurden die Effekte der  $PKC\delta$  auf die Insulinsekretion untersucht, in einem zweiten Teil der Einfluss der  $PKC\delta$  auf die  $\beta$ -Zellmasse.

Für alle Untersuchungen standen transgene Mäuse zur Verfügung. Eine transgene Maus exprimiert eine Kinase inaktive Mutante der  $PKC\delta$  ( $PKC\delta KN$ ). Diese Veränderung reduziert durch kompetitive Hemmung die Funktion der endogenen  $PKC\delta$  (Wildtyp).

In der zweiten transgenen Maus ist die Wildtyp  $PKC\delta$  überexprimiert ( $PKC\delta tgWT$ ). Wichtig ist, dass sich die  $PKC\delta$  Überexpression, beziehungsweise die Überexpression von funktionsloser Kinase auf die  $\beta$ - Zellen beschränkt und dass dadurch alle anderen Organe in ihrer  $PKC\delta$  Expression unverändert sind.

Im einzelnen wurde untersucht, ob:

- die Glucose- induzierte Insulinsekretion in  $PKC\delta KN$  Mäusen verändert ist.
- die Insulinsekretion, aktiviert durch PKC- Agonisten und Stimulation der Adenylatzyklase, in den Inseln von  $PKC\delta KN$  Mäusen verändert ist.
- die Insulinsekretion stimuliert durch Fettsäuren in Inseln von  $PKC\delta KN$  Mäusen verändert ist.
- die Überexpression der  $PKC\delta KN$  den Insulingehalt der Inseln verändert.

- die Inselgröße in PKC $\delta$ KN Mäusen verändert ist.
- durch Einfluss einer hochkalorischen Ernährung (HFD) die Inselgröße in PKC $\delta$ KN Mäusen verändert ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mäuse

Die Experimente wurden an verschiedenen transgenen Mausmodellen im Vergleich mit Wildtyp- Mäusen durchgeführt. Die Wildtyp Mäuse stammen alle aus einem Black-6-Mausstamm, da dieser auch den Hintergrund für die transgenen Mäuse darstellt. Die Mäuse wurden gemäß der entsprechenden Vorschriften gehalten und versorgt. Es wurde ein 12 stündiger Tag/ Nacht- Rhythmus eingehalten und die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser. Alle Experimente wurden entsprechend der Tierschutzrichtlinien durchgeführt und waren behördlich genehmigt.

Die WT und die transgenen Mäuse eines Experiments waren jeweils Geschwister aus einem Wurf. Um die Verfälschung der Ergebnisse möglichst gering zu halten, wurden für die jeweiligen Experimente immer etwa gleich alte Mäuse und Tiere selben Geschlechts untersucht.

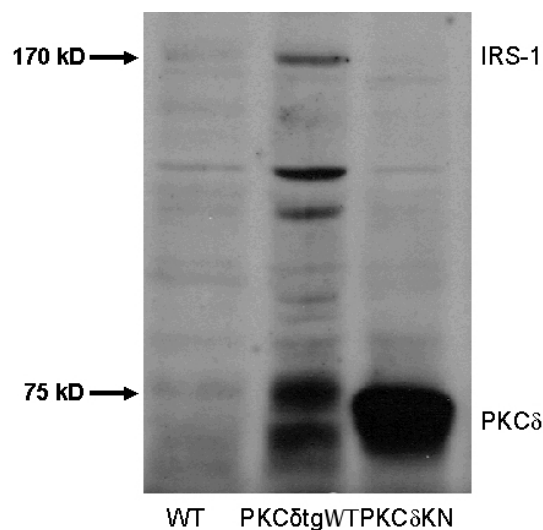


Abbildung 2.1: **Nachweis von PKC $\delta$** ; Überexpression der WT Kinase in Inseln aus PKC $\delta$ tgWT Mäusen und starker Expression der funktionslosen Kinase aus PKC $\delta$ KN Mäusen von A. Hennige, Med. Klinik IV, Tübingen.

Die Experimente wurden zum einen mit PKC $\delta$ KN Mäuse, die zuviel, allerdings funktionslose Proteinkinase C  $\delta$  exprimieren, durchgeführt. In diesen Mäusen unterdrückt die funktionslose Kinase die Funktion der endogenen PKC $\delta$  durch

kompetitive Hemmung. Zum anderen wurden die Experimente mit PKC $\delta$ tgWT Mäusen durchgeführt, die im Gegensatz dazu vermehrt die aktive WT- Kinase exprimieren. Um die Expression der transgenen Proteine nachzuweisen wurde ein Westernblot durchgeführt.

Wie man in Abbildung 2.1 sieht, exprimieren die PKC $\delta$ tgWT Mäuse deutlich vermehrte PKC $\delta$  im Vergleich zum Wildtyp. Die sehr stark verbreiterte Bande der PKC $\delta$ KN Maus, entspricht der großen Menge funktionsloser Kinase. Damit konnte gezeigt werden, dass die Generierung der transgenen PKC $\delta$  Mäuse erfolgreich war.

In diesen Studien haben wir PKC $\delta$ tgWT Mäuse nach hoher Fettdiät (HFD) für die Immunhistochemie genutzt und mit WT Mäusen mit und ohne HFD und PKC $\delta$ KN Mäusen ohne HFD verglichen. Bei den Mäusen, die zur Untersuchung der Insulinsekretion benutzt wurden, handelte es sich um PKC $\delta$ KN Mäuse im Vergleich mit WT Mäusen. Diese erhielten vor den Sekretionsmessungen keine HFD.

### **2.1.1 Generation der transgenen Mäuse**

Die PKC $\delta$ KN Maus hat eine Mutation an der C3- Domäne, der ATP- Bindungsstelle der PKC $\delta$ , was die Funktionslosigkeit der Proteinkinase zur Folge hat. Die Veränderung wird durch eine Punktmutation, bei der anstatt der Aminosäure Lysin, Arginin an Position 376 der Aminosäurekette steht, erreicht. Die PKC $\delta$ KN Mäuse werden generiert, wie schon vorher beschrieben [31], indem man das entsprechend mutierte Gen aus einem Plasmid exzidiert und mittels Mikroinjektion, in befruchtete Eizellen einbringt. Bei dem mutierten Gen handelt es sich um das RIP-I/PKC $\delta$ KN Gen. Der RIP-I Promotor (Ratteninsulinpromotor-1) ermöglicht die spezifische Expression in insulinproduzierenden Zellen. Die transgenen Mauslinien wurden anschließend in den C57Bl/6 Hintergrund rückgekreuzt.

Sie zeigen eine normale Entwicklung und normale Fruchtbarkeit.

Die PKC $\delta$ tgWT Mäuse werden genau so wie die kinasenegativen Mäuse, durch Injektion des entsprechenden Gens in die befruchtete Eizellen generiert. Hier wird allerdings anstatt des mutierten Gens das WT Gen injiziert. Die Mäuse, die dann die WT- PKC $\delta$  überexprimieren werden über PCR selektiert.

### **2.1.2 Behandlung der Mäuse**

In einem Teil der Experimente wurden die Mäuse mit einem hochkalorischen, fettreichen Futter (HFD) gefüttert, um den Einfluss von Fett in der Nahrung auf die Inselgröße zu untersuchen. Die Kontrollmäuse wurden parallel mit normalem

Standardfutter gefüttert. Im Rahmen der HFD bekamen die Mäuse bis zum Alter von 4 Wochen normales Futter und ab diesem Zeitpunkt für 8 Wochen nur hochkalorisches Futter mit 45 kal % Fett aus Schweineschmalz ( D12451, Reasearch Diet Inc., New Brunswick, NJ, USA). Nach Ende der HFD wurden die Mäuse getötet und das Pankreas für die histologischen Untersuchungen entnommen. Während der Zeit der Fettfütterung wurde wöchentlich das Gewicht und die Blutglucosewerte der Mäuse gemessen. Im Gewichtsverlauf stellt man eine deutliche Gewichtszunahme bei allen Mäusen fest. Die WT Mäuse haben in den 8 Wochen im Mittel 10 Gramm und die PKC $\delta$ tgWT Mäuse 8 Gramm zugenommen. Auch in den Blutglucosewerten zeigen sich ähnliche Werte bei beiden Mauslinien. Die WT Mäuse hatten einen Mittelwert der Blutglucose von 136 mg/dl, die PKC $\delta$ tgWT Mäuse eine mittlere Blutglucose von 139 mg/dl. Wie man in Abbildung

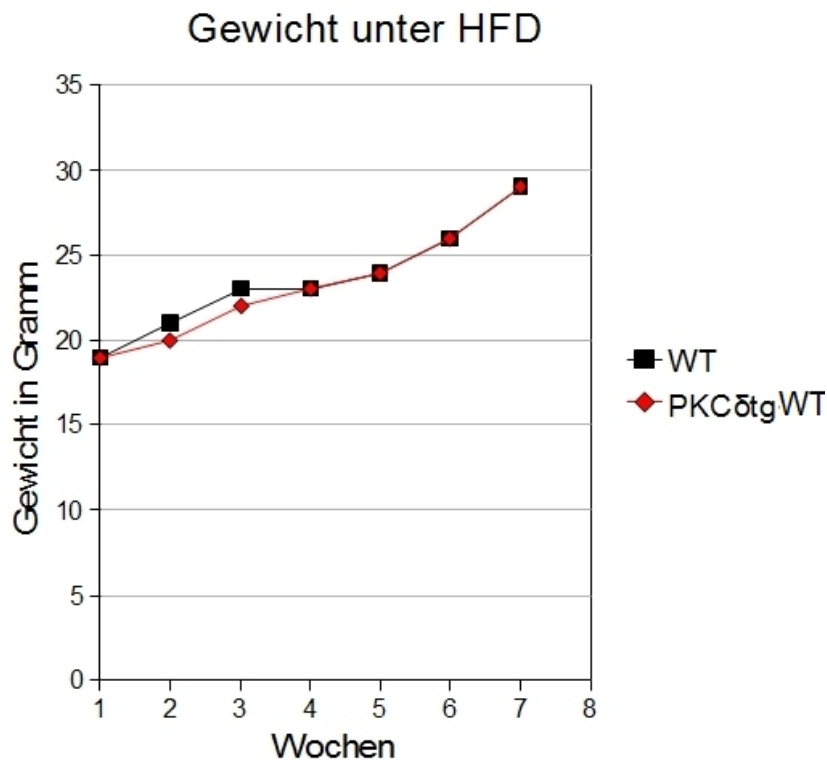


Abbildung 2.2: **Gewichtsverlauf während der hohen Fettdiät**; Messungen an je 2 WT und 2 PKC $\delta$ tgWT Mäusen, Messungen von A. Hennige, Med. Klinik IV, Tübingen.

2.2 sieht, führt die unterschiedliche Expression von PKC $\delta$  zu keinem signifikanten Unterschied in der Gewichtsentwicklung der Mäuse. Auch die Unterschiede der gemessenen Blutzuckerwerte zeigen zwischen den PKC $\delta$ tgWT und den WT

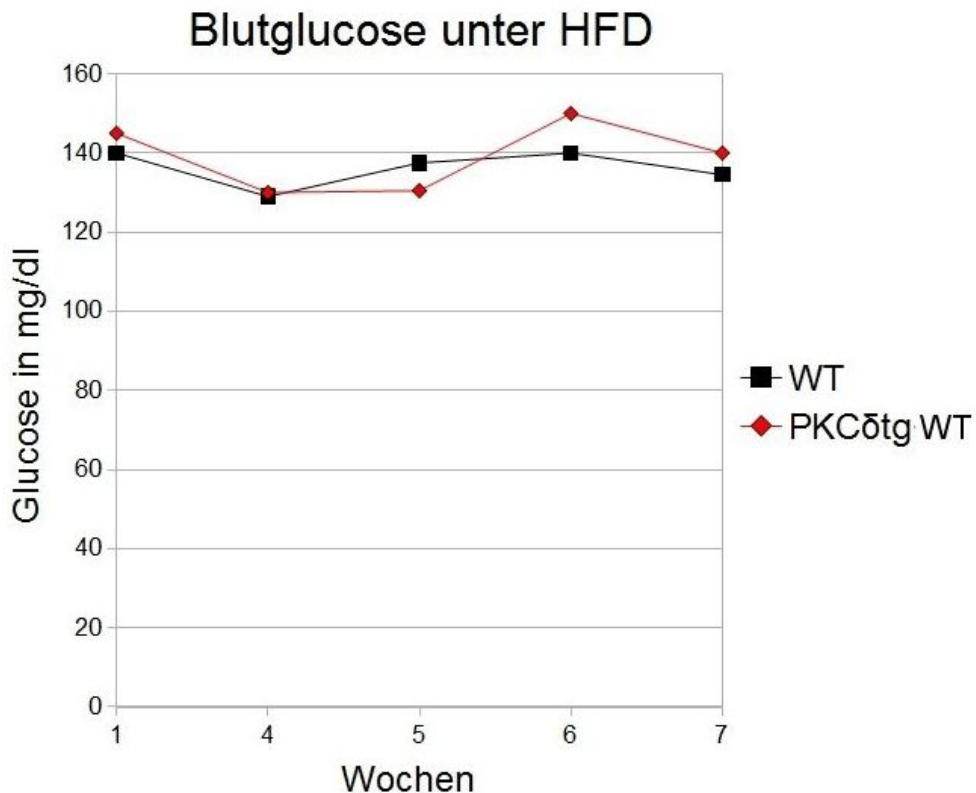


Abbildung 2.3: **Blutglucoseverlauf während der hohen Fettdiät**; Messungen an je 2 WT und 2 PKC $\delta$ tgWT Mäusen, Messungen A. Hennige, Med. Klinik IV, Tübingen.

Mäusen keine Signifikanz (siehe Abbildung 2.3).

## 2.2 Sekretionsmessungen

Die Sekretionsmessungen wurden an WT und PKC $\delta$ KN Mäusen nach normaler Fütterung, im Alter von neun bis 12 Monaten durchgeführt.

### 2.2.1 Genotypisierung

Bei der Insulinsekretionsmessung wurde jeweils am Versuchstag, das Pankreas einer WT und einer PKC $\delta$ KN Maus entnommen. Aus den entnommenen Pankreata der Mäuse wurden dann die Langerhans'schen Inseln isoliert, über Nacht kultiviert und am Folgetag mit den Testlösungen inkubiert.

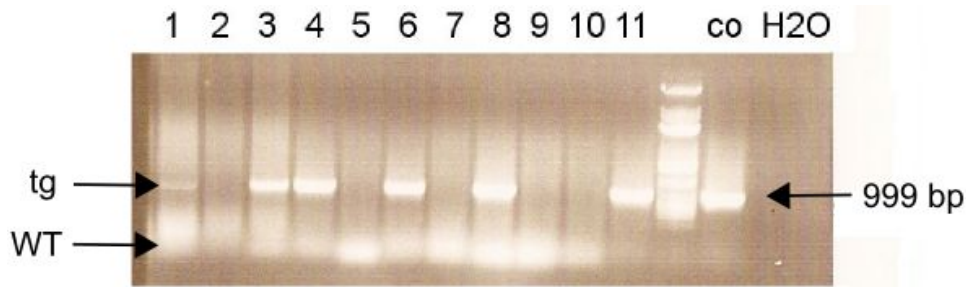


Abbildung 2.4: **Nachweis von endogener und transgener PKC $\delta$  aus Schwanzspitzen**; Mäuse 2, 5, 7, 9 und 10 sind WT, Mäuse 1, 3, 4, 6, 8 und 11 sind transgene Mäuse, tg = transgen, co= Positivkontrolle; von A. Hennige, Med. Klinik IV, Tübingen.

Nach der Pankreasentnahme wurde die jeweilige Schwanzspitze der Maus bei  $-20^{\circ}$  konserviert. Daraus wurde die DNA extrahiert und mittels PCR das Transgen vervielfältigt. Die PCR-Produkte wurden in einer Gelelektrophorese im Vergleich zu einer Positivkontrolle für PKC $\delta$  aufgetrennt. Auf diese Weise wurden die WT und transgenen Mäuse identifiziert.

Wie man in 2.4 an der deutlichen Bande auf Höhe der PKC $\delta$  Positivkontrolle erkennen kann, handelt es sich bei den Mäusen, Nummer 1, 3, 4, 6, 8 und 11 um PKC $\delta$ KN Mäuse. Die Bande entspricht der Überexpression der funktionslosen PKC $\delta$ . Damit war sicher gestellt, dass die Sekretionsmessungen jeweils an einer WT und einer entsprechenden PKC $\delta$ KN Maus durchgeführt worden sind.

## 2.2.2 Verwendete Substanzen

Für die Inselisolation und -inkubation wurden folgende Substanzen verwendet:

- Kollagenase aus *Cl. histolyticum*, (Nr.1745062 Serva, Heidelberg) wurde zum enzymatischen Verdau des Pankreas genutzt
- BSA (Bovines Serumalbumin) Fraktion V (SIGMA, München, D)
- BSA (Bovines Serumalbumin) fettsäurefrei (free fatty acid =FFA) (SIGMA, München, D)
- Forskolin (SIGMA, München, D): Stammt aus dem Harfenkraut (*Coleus forskohlii*) und ist ein bekanntes Stimulanz der Insulinsekretion. Durch direkte Stimulation der Adenylatzyklase führt es zu einer cAMP Erhöhung und letztendlich über diesen Weg zu einer Steigerung der Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen. Allerdings findet eine Stimulation nur bei hohen, ebenfalls stimulierenden Glucosekonzentrationen statt.[83]



- PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, SIGMA, München, D): Ist ein Phorboldiester, der direkt PKCs stimuliert [68] und somit ebenfalls die Insulinsekretion stimuliert. PMA ist auch unter dem Begriff TPA ( 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) bekannt.
- TUG209 = GW9508 (GlaxoSmithKline) ist ein Agonist des GPR40/ FFA1 Rezeptors. Bindet TUG209 als Ligand an den FFAR kommt es über PLC-Aktivierung zur Bildung von  $IP_3$  und DAG und konsekutiv zur Calciumfreisetzung und Aktivierung der PKC. Dies führt zu einer vermehrten Insulinsekretion. TUG209 wurde uns freundlicherweise von Trond Ulven, Universität von Süd- Dänemark, Odense, Dänemark zur Verfügung gestellt.
- Carbachol (SIGMA, München, D): Ist ein Parasympathomimetikum, das an den muskarinischen Acetylcholinrezeptor bindet und dadurch G-Protein gekoppelt über PLC Aktivierung zur Freisetzung von  $IP_3$  und DAG und letztendlich zur Sekretionssteigerung der  $\beta$ - Zellen führt.
- Palmitat (SIGMA, München, D): Ist eine gesättigte Fettsäure, die aus 16 Kohlenstoffatomen besteht,  $C_{16}H_{32}O_2$ .
- Oleat (SIGMA, München, D): Oleat ist eine einfach ungesättigte Fettsäure mit 18 Kohlenstoffatomen,  $C_{18}H_{34}O_2$ .

### 2.2.3 Verwendete Lösungen

Zur Bestimmung der Insulinsekretion wurden folgende Lösungen benötigt:

#### Hanks- Lösung

Hanks- Lösung wird für die Inselisolation aus den entnommenen Pankreata benutzt. Hanks- Lösung wird als Stammlösung in vierfacher Konzentration hergestellt und erst am Tag des Experiments zu Präparierlösung A verdünnt.

Die einzelnen Reagenzien werden alle bis auf  $CaCl_2$  zusammen eingewogen und in destilliertem  $H_2O$  gelöst.  $CaCl_2$  wird separat in 10 ml  $H_2O$  gelöst, damit es nicht als  $Ca^{2+} PO_4$  ausfällt. Insgesamt ergibt dies 1 Liter 4-fach konzentrierte Hanks-Lösung.

#### Präparierlösung A

Die Präparierlösung A wird bei der Inselisolation zur Herstellung der Kollagenase-lösung verwendet. Sie entspricht einfacher Hanks- Lösung und wird am Tag des

32 g	<b>NaCl</b> (Endkonzentration:137 mM)
1,6 g	<b>KCl</b> ( 4,8 mM)
0,74 g	<b>CaCl<sub>2</sub> X 2H<sub>2</sub>O</b> (1,3 mM)
0,8 g	<b>MgSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O</b> (1,2 mM)
0,24 g	<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> X 2H<sub>2</sub>O</b> (1,3 mM)
0,24 g	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> (1,2 mM)
1,4 g	<b>NaHCO<sub>3</sub></b> (5 mM)
9,5 g	<b>Hepes</b> (10 mM)

Tabelle 2.1: Hanks- Lösung 4-fach konzentriert

Experiments durch Verdünnen und durch Zugabe von 0,11 g Glucose pro 200 ml Lösung hergestellt. Durch die Glucosezugabe erreicht man die gewünschte 2,8 mM Glucosekonzentration, die physiologischer Weise unterhalb der Sekretionsschwelle der Inseln liegt. Für die Präparation von zwei Mäusen werden 600 ml Präparierlösung A hergestellt.

150 ml	<b>Hanks Lösung</b> (4fach konzentriert)
450 ml	<b>Aqua dest.</b>
330 mg	<b>Glucose</b>

Tabelle 2.2: Präparierlösung A/ Hanks Lösung einfach konzentriert

Der pH Wert wird bei Zimmertempertur mit 1 M NaOH auf 7,25 titriert. Die Lösung wird während des Experiments auf Eis aufbewahrt.

### **Präparierlösung B**

Präparierlösung B entspricht einfacher Hanks- Lösung mit BSA.

Man entnimmt 30 ml Präparierlösung A, da diese für die Kollagenaselösung benötigt wird, der Rest wird zusammen mit BSA (Bovines Serum Albumin) zur Zubereitung von Präparierlösung B benötigt.

570 ml	<b>Präparierlösung A</b>
1,65 g	<b>BSA</b>

Tabelle 2.3: Präparierlösung B/ Hanks Lösung mit BSA

Mit der eiskalten Präparierlösung B wird der Kollagenase induzierten Verdau des Pankreas gestoppt. Das BSA dient dazu die Enzymwirkung der Kollagenase zu hemmen.

Die fertige Präparierlösung B wird ebenfalls auf Eis aufbewahrt.

## Die Kollagenaselösung

Um die Kollagenaselösung für den Verdau des Pankreas herzustellen, benutzt man die Präparierlösung A. Pro Maus werden 3 ml einer 1 mg/ ml konzentrierten Kollagenaselösung hergestellt. Zum Schluß gibt man auf 3 ml Lösung noch 16,25  $\mu$ l 1 M  $\text{CaCl}_2$ .

6 ml	<b>Präparierlösung A</b>
6 mg	<b>Kollagenase</b>
32,5 $\mu$ l	<b><math>\text{CaCl}_2</math> (1 M)</b>

Tabelle 2.4: Kollagenaselösung

Die Kollagenase muss sich vollständig lösen. Die Kollagenaselösung muss immer frisch zubereitet werden, da Kollagenase sehr instabil ist. Die fertige Lösung wird auf Eis aufbewahrt.

## Kulturmedium

Vor der Inkubation der Inseln in den verschiedenen Testsubstanzen wurden diese zuerst über Nacht kultiviert, dabei hat das Kulturmedium folgende Zusammensetzung:

86 ml	<b>RPMI1640 Medium</b> (GIBCO, Eggenstein, Deutschland)
10 ml	<b>FCS (10 %)</b> (Biochrom, Berlin, Deutschland)
1 ml	<b>Penicillin/Streptomycin</b> (Lonza, Basel, Schweiz)
1 ml	<b>L-Glutamin ( 2 mM)</b> (Lonza, Basel, Schweiz)
1 ml	<b>Pyruvat (1 mM)</b> (Lonza, Basel, Schweiz)
1 ml	<b>Hepes (10 mM)</b> (Lonza, Basel, Schweiz)

Tabelle 2.5: Kulturmedium

Das Kulturmedium der Inseln wird in der Sterilbank hergestellt, um eine Kontamination mit Bakterien, Viren und Pilzen zu vermeiden.

## Inkubationslösungen

Die Inseln werden in Krebs- Ringer Puffer mit den Testsubstanzen, entsprechend des jeweiligen Protokolls inkubiert. Der Krebs- Ringer Puffer wird aus zwei Konzentratlösungen am Tag der Inkubation frisch hergestellt.

Alle Reagenzien werden abgewogen und mit dem seperat in 10 ml gelösten  $\text{CaCl}_2$  in destilliertem  $\text{H}_2\text{O}$  vermischt, so dass ein Liter fertiges Konzentrat entsteht.

35,4 g **NaCl** (Endkonzentration: 137 mM)  
 1,77 g **KCl** (4,8 mM)  
 1,463 g **MgSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O** (1,2 mM)  
 0,735 g **CaCl<sub>2</sub>** (1,3 mM)  
 0,808 g **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** (1,2 mM)

Tabelle 2.6: Konzentrat 1 (mixed salts)

Für Konzentrat 2 werden die Substanzen ebenfalls abgewogen und in Aqua dest. gelöst.

5,347 g **NaCl**  
 2,625 g **NaHCO<sub>3</sub>** (5 mM)

Tabelle 2.7: Konzentrat 2 (NaCl/NaHCO<sub>3</sub>)

Die angegebene Menge an Reagenzien ergibt ebenfalls einen Liter fertige Lösung. Die beiden Konzentrate können bei 4°C einige Tage aufbewahrt werden.

20 ml **Konzentrat 1**  
 16 ml **Konzentrat 2**  
 1 ml **HEPES 1M** (10 mM)  
 200 mg **BSA** (0,2 %)  
 63 ml **H<sub>2</sub>O**

Tabelle 2.8: Inkubationslösung gebrauchsfertig/ Krebs- Ringer Puffer

Am Tag des Versuchs wird der Krebs- Ringer Puffer wie in Tabelle 2.8 zu sehen frisch hergestellt und mit 1 M NaOH auf einen pH von 7,4 titriert.

Der fertige Krebs-Ringer Puffer diente als Stammlösung zur Herstellung der Inkubationslösungen sowohl für die Glucose- abhängige Stimulation, als auch für die Stimulation mit weiteren Testsubstanzen und die durch Fettsäuren stimulierte Insulinsekretion.

Auf die Herstellung der einzelnen Inkubationslösungen wird im Verlauf genauer eingegangen.

**Glucose abhängige Stimulation** In einem Teil der Experimente wurden die Inseln mit steigender Glucosekonzentrationen inkubiert um die Glucose- induzierte Insulinsekretion zwischen den WT und den PKC $\delta$ KN Inseln zu vergleichen. Durch die Stimulation nur mit Glucose, sollte die physiologische Insulinantwort der Inseln ohne weitere Stimulanzen verglichen werden.

Für diese Versuche wurden die Inkubationslösungen A bis F hergestellt. Aus dem

Krebs-Ringer Puffer wurde zuerst die Inkubationslösung A hergestellt (siehe unten), die dann als Grundlage zur Herstellung der Lösungen B bis F diente. Für einen Teil der Experimente wurde Fraktion V BSA benutzt. In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Lösungen mit fettsäurefreiem BSA hergestellt.

- **Inkubationslösung A**

Die Inkubationslösung A enthält eine Glucosekonzentration von 20 mM. Die Glucosekonzentration von 20 mM stellt für die  $\beta$ - Zellen eine Konzentration dar, die zu maximaler Insulinsekretion führt und einer behandlungsbedürftigen Hyperglykämie entspricht.

- **Inkuabtionslösung B**

Die Inkubationslösung B enthält 12 mM Glucose und wird durch Verdünnung von Inkubationslösung A mit Krebs- Ringer Puffer erreicht. Die Verdünnung wird mit folgender Formel, die auch bei den Inkubationslösungen C- L zum Einsatz kommt, berechnet:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Für 10 ml Inkubationlösung B benötigt man also:

$$20 \text{ mM} \times V_i = 12 \text{ mM} \times 10 \text{ ml} \rightarrow V_i = (12 \text{ mM} \times 10 \text{ ml}) : 20 \text{ mM} = 6 \text{ ml.}$$

Es werden also 6 ml Lösung A plus 4 ml Krebs- Ringer Puffer vermischt um die 12 mM Glucosekonzentration zu erhalten.

- **Inkubationslösung C**

Die Inkubationslösung C hat eine Glucosekonzentration von 8 mM und wird wie Inkubationslösung B ebenfalls durch Verdünnung entsprechend der gleichen Formel hergestellt.

- **Inkubationslösung D**

Inkubationslösung D enthält 6 mM Glucose.

- **Inkubationslösung E**

Inkubationslösung E enthält 4 mM Glucose.

- **Inkubationslösung F**

Inkubationslösung F enthält 2,8 mM Glucose.

Die Inkubationslösungen D,E und F mit jeweils 6, 4 und 2,8 mM Glucosekonzentration werden auch wie oben beschrieben durch Verdünnung der Inkubationslösung A als Ausgangslösung hergestellt.

Die physiologische Glucosekonzentration von 5 mM stellt dabei den normalen Schwellenwert dar, höhere Konzentrationen wirken stimulierend auf die Insulinsekretion.

Inkubationslösung F mit 2,8 mM Glucosekonzentration wurde in allen Sekretionsmessungen zur Vorinkubation eingesetzt und diente dazu die Insel durch die niedrige Glucosekonzentration in einen nicht sezernierenden Ruhezustand zu versetzen, insbesondere da das Kulturmedium 11 mM Glucose enthält, eine Konzentration, die die Insulinsekretion stimuliert.

**Stimulation bei 12 mM Glucose und weiteren Testsubstanzen** Bei einem Teil der Experimente wurden zusätzliche Stimulanzen der Insulinsekretion zur Inkubationslösung gegeben. Dadurch sollte gezeigt werden, ob durch Aktivierung zusätzlicher Signalwege eine weitere Stimulation der Insulinsekretion erreicht werden kann und ob sich hier Unterschiede zwischen den WT Mäusen und den PKC $\delta$ KN Mäusen zeigen. Über welche Signalkaskaden die Testsubstanzen die Insulinsekretion zusätzlich modifizieren ist in 2.2.1. erläutert.

Diese Sekretionsmessungen mit zusätzlichen Testsubstanzen wurden alle mit BSA Fraktion V durchgeführt. Hier wurde kein fettsäurefreies BSA verwendet. Für diese Versuche wurde entsprechend der Inkubationslösung A in den Glucose abhängigen Stimulationen, eine hier allerdings 12 mM Stammlösung hergestellt.

- **Inkubationslösung G**

Die Inkubationslösung G enthält 12 mM Glucose + 5  $\mu$ M Forskolin. Das Forskolinkonzentrat lag in einer Konzentration von 10 mM in DMSO vor. Mit der oben genannte Formel wird berechnet, wieviel des Konzentrats in der 12 mM Glucoselösung verdünnt wird um die Endkonzentration von 5  $\mu$ M zu erhalten.

Nach Verdünnung von 2,5  $\mu$ l Forskolin- Konzentrat in 5 ml 12 mM Glucose- lösung erhält man gebrauchsfertige Inkubationslösung G.

- **Inkubationslösung H**

Die Inkubationslösung H enthält 12 mM Glucose + 100 nM PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat). Das PMA- Konzentrat mit 100  $\mu$ M in DMSO (Dimethylsulfoxid) wird in ebenfalls bis zur gewünschten Endkonzentration verdünnt.

Somit ist das Lösungsmittel DMSO 1: 1000 verdünnt.

- **Inkubationslösung I** Die Inkubationslösung I enthält 12 mM Glucose + 1

$\mu\text{M}$  Carbachol. Auch hier wird das 100 mM Carbachol- Konzentrat in  $\text{H}_2\text{O}$  entsprechend verdünnt.

- **Inkubationslösung J**

Die Inkubationslösung J enthält 12 mM Glucose + 1  $\mu\text{M}$  GPR 40 Agonist(TUG209). Das 1 mM Konzentrat in  $\text{H}_2\text{O}$  wird 1: 1000 mit 12 mM Glucoselösung bis zur gewünschten Endkonzentration verdünnt.

**Inkubation mit Fettsäuren** Des Weiteren wurde die Insulinsekretion der WT und der  $\text{PKC}\delta$  Inseln bei Inkubation mit Fettsäuren untersucht. Dafür wurde zum einen die gesättigte Fettsäure Palmitat und zum anderen die einfach ungesättigte Fettsäure Oleat verwendet. Diese Versuche wurden mit fettsäurefreiem BSA durchgeführt.

- **Inkubationslösung K**

Die Inkubationslösung K enthält gelöstes Palmitat, in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Zur Herstellung der Inkubationslösung wird eine 200 mM Konzentratlösung von Palmitat in DMSO in Krebs- Ringer Puffer, welcher 0,2 % fettsäurefreies BSA enthält, verdünnt.

- **Inkubationslösung L**

Die Inkubationslösung L enthält gelöstes, einfach ungesättigtes Oleat in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  und wurde entsprechend der Inkubationslösung K hergestellt.

## 2.2.4 Isolation der Inseln

Um einen Selbstverdau des Pankreas zu vermeiden, ist es wichtig nach dem Exitus der Mäuse zügig zu präparieren.

Die Mäuse werden tierartgerecht getötet und das Abdomen wird durch einen Längsschnitt eröffnet. Zuerst wird die gemeinsame Mündungsstelle des Ductus pancreaticus mit dem Ductus choledochus in den Zwölffingerdarm, die Papilla duodeni major, frei präpariert. Proximal und distal der Papille wird der Zwölffingerdarm mit Klemmen verschlossen und der Ductus choledochus wird möglichst kurz nach seinem Austritt aus der Leber ligiert. Auf diese Weise wird sicher gestellt, dass die injizierte Kollagenase- Flüssigkeit retrograd durch den Ductus pancreaticus ins Pankreas gelangt und nicht etwa in die Leber oder ins Duodenum austritt. Nun wird unter dem Binokular ein kleiner Schnitt mit der Mikroschere

über der Papille gemacht und die stumpfe Nadel wird unter Sicht in den Ductus pancreaticocholedochus eingeführt. Langsam werden 3 ml Kollagenaselösung injiziert. Nach der Injektion schneidet man das, durch die injizierte Lösung deutlich aufgetriebene Pankreas, vorsichtig heraus. Dabei ist es wichtig das Pankreasgewebe nicht zu beschädigen, da die Kollagenaselösung sonst austritt und kein vollständiger Verdau des Gewebes erfolgt.

Das so vorbereitete Pankreas wird in ein 50 ml Plastikröhrchen (Falcon) gegeben und für 11 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit stoppt man den Verdau durch Zugabe von 20 ml eiskalter Präparierlösung B. Durch schütteln des Falcons wird kontrolliert ob das Pankreas leicht zerfällt. Anschließend zentrifugiert man das verdaute Gewebe 60 Sekunden bei 18,85 g (300 rpm). Der Überstand wird verworfen. Durch sechsmaliges langsames Auf- und Abziehen in einer stumpfen Spritze mit Metallkanüle mit 0,2 mm Durchmesser (1.8G), wird der Verdau des Gewebes mechanisch unterstützt ("gently agitating"). Danach wird das Homogenat mit 20 ml frischer Lösung verdünnt und erneut 60 Sekunden bei 18,85 g (300 rpm) zentrifugiert. Wiederum verwirft man den Überstand und wiederholt das "gently agitating", indem man das Gewebe in der Spritze noch viermal auf- und abzieht. Die ganze Zeit über bewahrt man das Röhrchen auf Eis auf und auch die Zentrifuge sollte auf 4°C vorgekühlt sein.

Das so verdaute Pankreasgewebe gießt man über ein kleines Teesieb, das die großen Teile exokrinen und nicht verdauten Gewebes zurückhält, in eine von unten schwarz gefärbte Petrischale.

Schaut man nun durch das Binokular, erkennt man die Langerhans'schen Inseln als leuchtend weiße, runde Punkte hervorstechen. Die weitere Aufbereitung der Insel erfolgt manuell. Indem man die Inseln mit einer Pipette aus der Petrischale heraus liest und sie in eine zweite schwarze Petrischale mit frischer Präparierlösung B überführt, werden die Inseln vom exokrinen Gewebe getrennt. Die Inseln werden solange in frisches Medium überführt, bis kein exokrines Gewebe mehr zu sehen ist. Die gereinigten Inseln gibt man in ein 15 ml Röhrchen.

Die Aufreinigung erfolgt auf Eis, um exokrine Verdauungsenzyme zu hemmen.

### **2.2.5 Kultur der Inseln**

Alle weiteren Schritt werden in der Sterilbank durchgeführt.

Zuerst wird wie unter 2.2.2 beschrieben das Kulturmedium zubereitet.

Die aufgereinigten Inseln, die im 15 ml Röhrchen sedimentieren, sieht man als kleine weißliche Ablagerung am Grund des Röhrchens. Um die Inseln für die



Kultur über Nacht steril zu machen wird die Präparierlösung B aus dem 15 ml Röhrchen vorsichtig abgesaugt und die Inseln werden mit einer großen Pipette aufgenommen. Um alle Inseln vollständig und unversehrt in die Pipettenspitze aufnehmen zu können, pipettiert man zuerst vorsichtig auf und ab, um keine Inseln, die am Röhrchen haften, zu verlieren. Nun legt man die Inseln tropfenweise auf den Flüssigkeitsspiegel in ein 15 ml Röhrchen, das mit frischem 10 ml sterilem Kulturmedium befüllt ist. Die Inseln werden bei 18,85 g (300 rpm) 60 Sekunden sedimentiert. Nun wird der Überstand abgesaugt und die Inseln werden nochmals auf den Flüssigkeitsspiegel eines neuen Röhrchen mit frischem Kulturmedium gegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation, wird der Überstand entfernt und die nun sauberen Inseln in eine nicht- ädhäsive, mit 2 ml Kulturmedium befüllte Petrischale gegeben.

Die Kultur erfolgt über Nacht im Brutschrank bei 37°C, bei einer Begasung von 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % O<sub>2</sub>.

## **2.2.6 Vorinkubation der Inseln**

Zur Vorinkubation werden die Inseln zuerst alle in ein Eppendorfröhrchen transferiert und mit 0,5 ml Inkubationslösung F, die 2,8 mM Glucose enthält, bei 37°C im Wasserbad 1 Stunde vorinkubiert.

## **2.2.7 Inkubation der Inseln**

Nach der Vorinkubation werden unter dem Binokular bei Zimmertemperatur möglichst schnell, jeweils 5 Inseln in einer Pipettenspitze mit insgesamt 50 µl eingesammelt und in ein neues Eppendorfröhrchen überführt. Dann werden die Inseln mit 0,5 ml der jeweiligen zu testenden Inkubationslösung A- L bedeckt. Mit den Testsubstanzen wird nochmals für 1 h bei 37°C inkubiert.

Danach wird die Insulinsekretion der Inseln durch Kühlung auf Eis gestoppt. Eine Zentrifugation bei 390 g (2000 rpm) für 1 min garantiert, dass sich die Inseln am Boden des Eppendorfgefäß befinden. Nun nimmt man vom Überstand 350 µl ab und gibt diesen in ein frisches Eppendorfröhrchen. Aus diesem Überstand wird die sezernierte Menge an Insulin bestimmt. Die restliche Flüssigkeit wird entfernt und auf die verbleibenden 5 Inseln gibt man 0,5 ml sauren Ethanol, der das Insulin extrahiert und vor Verdau schützt, so dass der intransuläre Insulingehalt messbar ist.

## 2.2.8 Messung der Insulinkonzentration

Der Insulingehalt des Überstands und der, der Inseln wurde mit dem Mercodia Rat Insulin ELISA (cat. no. 101124-01 Mercodia, Sweden), entsprechend der Anleitung, gemessen.

## 2.3 Die Immunhistochemie

Um eine Abschätzung der Größe der Inseln durchführen zu können, wurde auf Semidünnschnitten immunhistochemisch Insulin markiert. Hierfür wurden WT Mäuse und PKC $\delta$ KN Mäuse nach normaler Fütterung und WT und PKC $\delta$ tgWT Mäusen nach HFD ( Fettfütterung) verglichen.

Zur immunhistochemischen Darstellung der Inseln wurden die Pankreata der Mäuse nach Tötung entnommen, in Einbettmedium eingefroren, geschnitten und nach einem Protokoll zur Insulinfärbung behandelt. Die Inselgröße wurde unter dem Mikroskop mit einem speziellen Programm von Carl Zeiss (AxioVision LE) ausgemessen.

### 2.3.1 Verwendete Substanzen

- Tissue- Tek 4566 Cryomold Intermediate, Sakura Finetek, USA
- Jung Einbettmedium, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland (Nr.0201 08926)
- DAKO Protein Block ( DAKO; Nr. X0909)
- Polyklonaler Anti-Insulin-AK ( DAKO; Nr. A0564)
- Vectastain Rabbit ABC Kit (Vector/Linaris Nr. PK-6101)
- AEC- Kit (Vector/Linaris; Nr. SK-4200)

- SuperFrostPlus Objektträger, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland (Nr.03-0060)
- Eindeckelmedium: Aquatex, Merck (Nr. 1.08562.0050)
- Mikroskop: AxioVision 40 von Carl Zeiss Vision GmbH
- Programm zum Messen der Inseln: AxioVision Rel. LE 4.4.0.0 von Carl Zeiss Vision GmbH
- Dako Pen (DAKO; Nr.S2002)

### 2.3.2 Verwendete Lösungen

Zur Insulinfärbung wurden folgende Lösungen verwendet:

- PBS (phosphate buffered saline): PBS wurde, wie folgt, in zehnfacher Konzentration hergestellt und bei Bedarf 1:10 in Aqua bidest. verdünnt.

80 g **NaCl** (Endkonzentration:137 mM)  
 2,0 g **KCl**(2,7 mM)  
 26,8 g **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O**(9 mM)  
 2,4 g **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**(2,3 mM)

Tabelle 2.9: PBS 10-fach konzentriert

Die Reagenzien werden gelöst und der pH Wert wird auf 7,4 eingestellt. Insgesamt ergibt dies einen Liter 10- fach konzentrierte Lösung.

### 2.3.3 Die Kryoschnitte

Für die immunhistochemische Färbung werden die Mäuse getötet und das Pankreas vollständig entnommen. Das Pankreas wird in ein, etwas mit dem Einfriermedium „tissue teck“ befülltes, gefrorenes „cryomold“ gelegt und völlig mit „tissue teck“ bedeckt. So vorbereitet wird das Gewebe bei -80 °C gefroren.

Am Kryotom wird das Präparat mit einer Schnittdicke von 5  $\mu\text{m}$  bei -20 °C geschnitten und der Schnitt auf einen raumtemperierten Objektträger aufgezogen. Pro Objektträger werden 2 Gewebeschnitte aufgezogen. Diese lässt man für 10 Minuten antrocknen und bewahrt sie dann bei -80 °C auf.

### 2.3.4 Die Färbung

Die Objektträger werden zum Beginn der Färbung 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und danach 2 Minuten in  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltes Aceton gestellt. Nun werden sie nochmals für 30 Minuten getrocknet. Jeder Schnitt auf dem Objektträger wird mit dem "Dako-Pen" umrandet um sie separat inkubieren zu können. Ab dem nächsten Schritt findet die Färbung in einer feuchten Kammer statt.

Die Schnitte werden mit dem Serum aus dem Vectastain Kit für 30 Minuten geblockt. Die Lösungen werden jeweils durch Abkippen entfernt. Als nächstes appliziert man den Primärantikörper (anti- Insulin) 1:50 in PBS verdünnt auf einen der beiden Gewebeschnitte auf dem Objektträger und lässt diesen über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubieren. Der zweite Schnitt wird mit PBS ohne Antikörper als Kontrolle inkubiert. Ab dann werden die beiden Schnitte im weiteren Verlauf genau gleich behandelt. Am nächsten Tag werden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen. Dann blockt man die Aktivität der endogenen Peroxidase, indem man 0,3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBS aufträgt. Erneut werden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen. Nun gibt man den Sekundärantikörper (anti- rabbit biotiniliert) ebenfalls aus dem Vectastain Kit in der Verdünnung 1:500 in PBS für 1 h auf die Schnitte. Wiederum wäscht man dreimal in PBS. Das ABC Reagenz, das an Biotin bindet und Peroxidaseaktivität besitzt, wird entsprechend der Anleitung 30 Minuten vor Benutzung angesetzt und nun für 30 Minuten auf die Schnitte gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS gibt man das AEC Reagenz, das das Substrat für die Peroxidase darstellt, auf das Gewebe. Die Peroxidasereaktion wird unter dem Mikroskop kontrolliert. Sobald eine deutliche Färbung sichtbar ist, wird die Reaktion in Leitungswasser gestoppt. Zum Schluss färbt man das Gewebe mit Hämatoxylin gegen, indem man die Schnitte für etwa 15 Sekunden in Hämatoxylinlösung taucht und sie danach mit Leitungswasser spült, bis keine blauen Schlieren mehr im Leitungswasser sichtbar sind. Abschließend werden die Objektträger mit einem wasserlöslichen Eindeckelmedium mit Deckgläsern versehen und getrocknet.

### 2.3.5 Das Ausmessen der Inseln

Nach der Färbung wurde das insulinpositive Gewebe mit dem Zeiss AxioVision Mikroskop fotografiert und ausgemessen.

Dabei wurde jeder 10. Schnitt beziehungsweise alle  $100\ \mu\text{m}$  angeschaut und jede insulinpositive Färbung fotografiert. Damit keine falsch positiven Ergebnisse ausgewertet werden, ist es wichtig, dass der Kontrollschnitt keine insulinpositive

Färbung aufweist. Anschließend wurde mit dem Axiovision LE Rel. 4.4 Programm durch Umfahren der Inselfläche die Größe der Inseln bestimmt.

Die Größe des gesamten Schnittes wurde makroskopisch bestimmt um damit auch die Inselfläche in Bezug zur Gewebefläche des Pankreas insgesamt setzen zu können.

## **2.4 Auswertung der Ergebnisse**

Die Ergebnisse werden in Graphiken dargestellt, die aus den Mittelwerten einer Versuchsreihe berechnet wurden. Der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) ist als Fehlerbalken dargestellt. Die Signifikanz von Ergebnissen wurde durch den „Student's t-Test“ für ungepaarte Messungen bestimmt. Werte ab  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Die Glucose- induzierte Insulinsekretion in WT und PKC $\delta$ KN Inseln

Zuerst soll untersucht werden, ob die Kinase negative Mutation der PKC $\delta$ KN Mäuse Einfluss auf die Glucose- induzierte Insulinsekretion hat. Hierzu wurden Inseln jeweils für eine Stunde bei 2,8 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 12 mM und 20 mM Glucosekonzentration inkubiert. Dabei wurden zum einen Experimente mit BSA Fraktion V und zum anderen mit fettsäurefreiem BSA durchgeführt, um eventuelle Unterschiede in der Insulinsekretion zwischen den beiden Albuminpräparaten vergleichen zu können. Die Mäuse dieser Versuche waren zwischen 9 und 12 Monate alt.

In Abbildung 3.1 wurden die oberen Ergebnisse bei Stimulation mit Glucose und fettsäurefreiem BSA (BSA fatty acid free) und die unteren bei Stimulation mit Glucose plus BSA Fraktion V erzielt. In den WT Inseln kommt es zu der erwarteten Sekretion. So wird die Insulinsekretion bei 2,8 mM und bei 6 mM Glucose nicht gesteigert, ist dann aber bei 12 mM und 20 mM Glucose signifikant gesteigert. Insgesamt führen die steigenden Glucosekonzentrationen sowohl bei den WT als auch bei den PKC $\delta$  Inseln zu einer Verdopplung der Insulinsekretion.

Man erkennt sowohl bei BSA Fraktion V als auch bei fettsäurefreiem BSA eine deutliche Mehrsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln gegenüber den WT Inseln. Bei Inkubation mit BSA Fraktion V ist die Sekretionsdifferenz bei 12 mM, bei Inkubation mit fettsäurefreiem BSA bei 6 mM signifikant höher als die Insulinsekretion der WT Mäuse. Auffällig ist auch, dass bei BSA Fraktion V die Insulinsekretion immer konstant über der WT Insulinsekretion liegt, wobei die Inkubation mit fettsäurefreiem BSA zu teilweise kaum differierenden Ergebnissen (2,8 mM, 12 mM) führt. Diese Ergebnisse führen zu der Überlegung ob die Fettsäuren, die in BSA Fraktion V im Gegensatz zu fettsäurefreiem BSA enthalten sind diesen, wenn auch leichten Unterschied, verursacht haben könnten. Allerdings sezernieren die WT und die PKC $\delta$ KN Inseln bei beiden BSA Sorten immer zwischen 0,6 % und 1,7 % ihres Gehalt und zeigen somit keinen deutlichen Unterschiede im Sekretionsverhalten. Aber im Vergleich zwischen WT und PKC $\delta$ KN Inseln muss man fest halten, dass die PKC $\delta$ KN Inseln konstant eine höhere Insulinsekretion zeigen, die aber nur punktuell signifiant ist. Bei der Inkubation mit fettsäurefreiem BSA

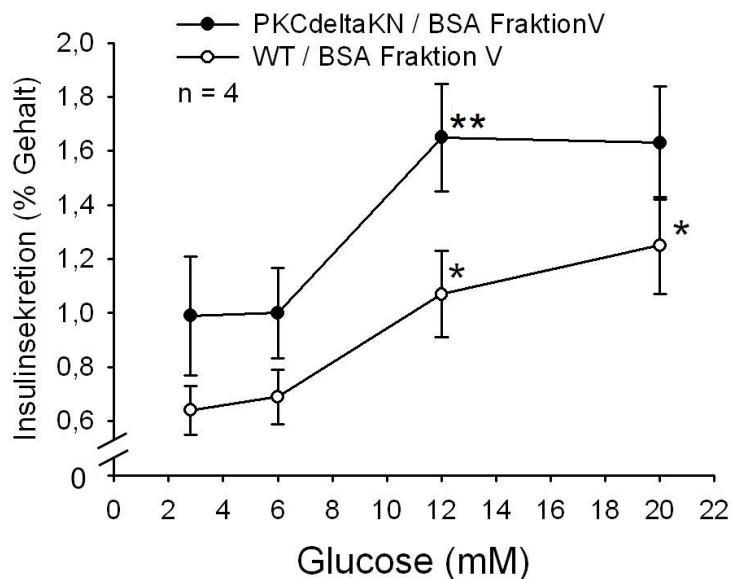
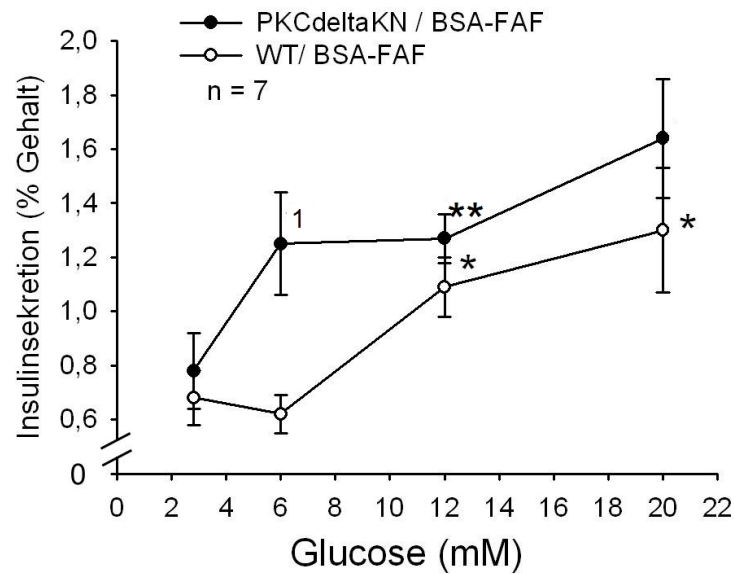


Abbildung 3.1: **Glucose- induzierte Insulinsekretion in WT und PKC $\delta$ KN Inseln**; Insulinmessung nach Inkubation für 1 h, obere Abb. nach Inkubation mit fettsäurefreiem BSA, untere Abb.: BSA Fraktion V, \* = signifikant gegenüber der Sekretion der WT Inseln bei 2,8 mM, \*\* = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln bei 2,8 mM, 1 = signifikant gegenüber dem Wert der WT Inseln, n = Anzahl der Versuche mit jeweils einer WT und einer PKC $\delta$ KN Maus.

ist außerdem auffällig, dass die PKC $\delta$ KN Inseln einen Anstieg der Insulinsekre-

tion schon bei 6 mM aufweisen, was bedeuten könnte, dass BSA Fraktion V die basale Sekretion niedrig hält.

### 3.2 Insulinsekretion in WT und PKC $\delta$ KN Inseln bei Stimulation mit Forskolin und PMA

Um zu untersuchen, ob die Insulinsekretion, die durch cAMP beziehungsweise PKC stimuliert wird, in PKC $\delta$ KN exprimierenden Inseln verändert ist, wurden die Inseln nach der Vorinkubation jeweils für eine Stunde in 5  $\mu$ M Forskolin oder 100 nM PMA jeweils in Anwesenheit von 12 mM Glucose inkubiert. Durch die Inkubation mit PMA werden direkt Proteinkinase C aktiviert und durch Forskolin wird die Adenylatzyklase stimuliert, was zu einer intrazellulären cAMP Erhöhung führt. Die Inseln dieser Experimente stammen aus 9 bis 12 Monate alten Mäusen. Wie

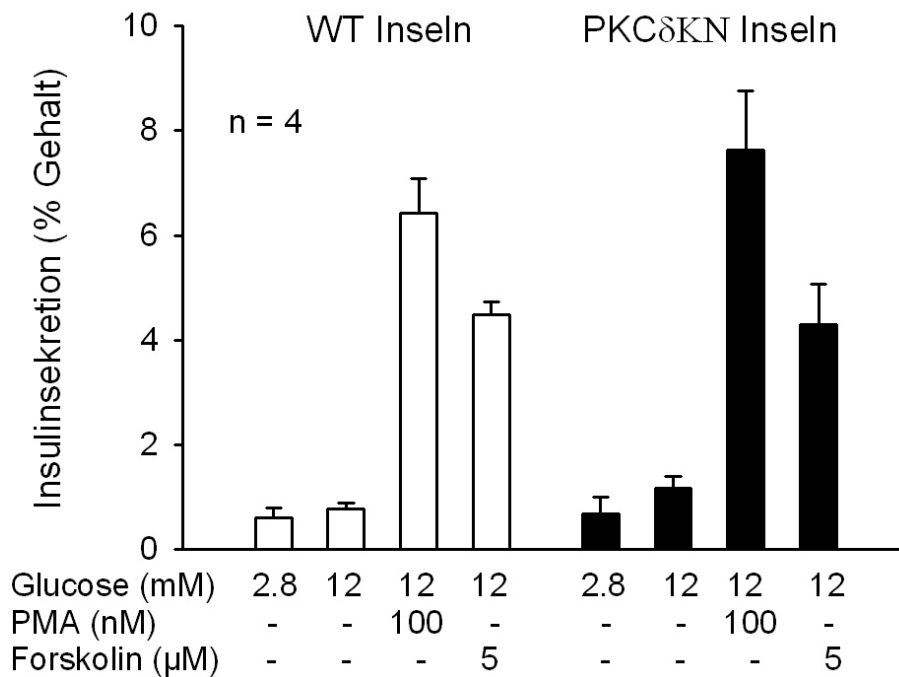


Abbildung 3.2: **Insulinsekretion nach Stimulation mit Forskolin und PMA**; Insulinmessung nach Inkubation für 1 h, n = Anzahl der Versuche mit je einer WT und einer PKC $\delta$ KN Maus.

man in Abbildung 3.2 sehen kann, hatte die alleinige Inkubation mit 12 mM Glucose keinen signifikanten Effekt auf die Insulinsekretion. Aber durch Zugabe von sowohl PMA wie auch Forskolin, kommt es in beiden Inseltypen zu einer signifikanten Steigerung der Insulinsekretion, wobei PMA bei beiden die größte Insulin-



ausschüttung verursacht. So kommt es durch PMA zu einer Sekretionssteigerung von 1,7 % des Gehaltes bei 12 mM Glucose, auf 6,5 % bei den WT Inseln und auf sogar 8 % in den PKC $\delta$ KN Inseln. Nach Forskolin Zugabe sezernieren sowohl die WT als auch die PKC $\delta$ KN Inseln etwa 5 % ihres Gehalts. Einen signifikanten Unterschied zwischen den WT Inseln und den PKC $\delta$ KN Inseln kann man nicht feststellen. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Expression von PKC $\delta$ KN keinen Einfluss auf die maximale Sekretion hat. Auffällig ist, dass die WT Inseln nur eine recht schwache Steigerung der Insulinausschüttung bei Stimulation mit 12 mM Glucose im Vergleich zu 2,8 mM Glucose zeigen.

### **3.3 Insulinsekretion in WT und PKC $\delta$ KN Inseln nach Inkubation mit Fettsäuren**

Da PKC $\delta$  Effekte von Fettsäuren in  $\beta$ - Zellen zu vermitteln scheint, soll nun die Insulinsekretion nach Inkubation mit Fettsäuren in den WT und den PKC $\delta$ KN Inseln untersucht werden. Die gesättigte Fettsäure Palmitat und die ungesättigte Fettsäure Oleat wurden in einer Konzentration von 100  $\mu$ M bei 2,8 mM und 12 mM Glucose getestet. Wie man in Abbildung 3.3 sieht stimulieren weder Palmitat noch Oleat bei niedriger Glucose die Insulinsekretion von WT Inseln. 12 mM Glucose stimuliert signifikant die Insulinsekretion der WT Inseln. Bei 12 mM Glucosekonzentration stimuliert sowohl Palmitat als auch Oleat die Insulinsekretion in den WT Inseln deutlich. Wobei die Stimulation mit 100  $\mu$ M Oleat zu einer signifikant höheren Insulinsekretion im Vergleich mit 12 mM Glucose ohne Fettsäuren führt. Palmitat steigert die Insulinsekretion ebenfalls deutlich, allerdings ist die Zunahme gegenüber 12 mM Glucose nicht signifikant.

Die Zunahme der Insulinsekretion von 2,8 mM Glucose auf 12 mM Glucose ist auch bei den PKC $\delta$ KN Inseln signifikant. Bei den PKC $\delta$ KN Inseln kommt es im Gegensatz zu den WT Inseln aber bei beiden Glucosekonzentrationen zu einer Stimulation der Insulinausschüttung durch die Fettsäuren. Hier ist die Differenz zwischen der Stimulation mit 2,8 mM Glucose alleine und mit Zugabe von sowohl Palmitat als auch Oleat signifikant. Wobei Oleat zu einer Sekretion von 2,3 % des Gehalts und Palmitat zu einer Sekretion von 1,5 % des Gehalts, verglichen mit einer basalen Sekretion von 0,9 % des Gehalts, führen. Auch bei 12 mM Glucosekonzentration führen beide Fettsäuren in den PKC $\delta$ KN Inseln zu einer signifikanten Sekretionssteigerung gegenüber der Stimulation nur mit Glucose. Die maximale Insulinsekretion beträgt sowohl bei WT als auch bei PKC $\delta$ KN Inseln

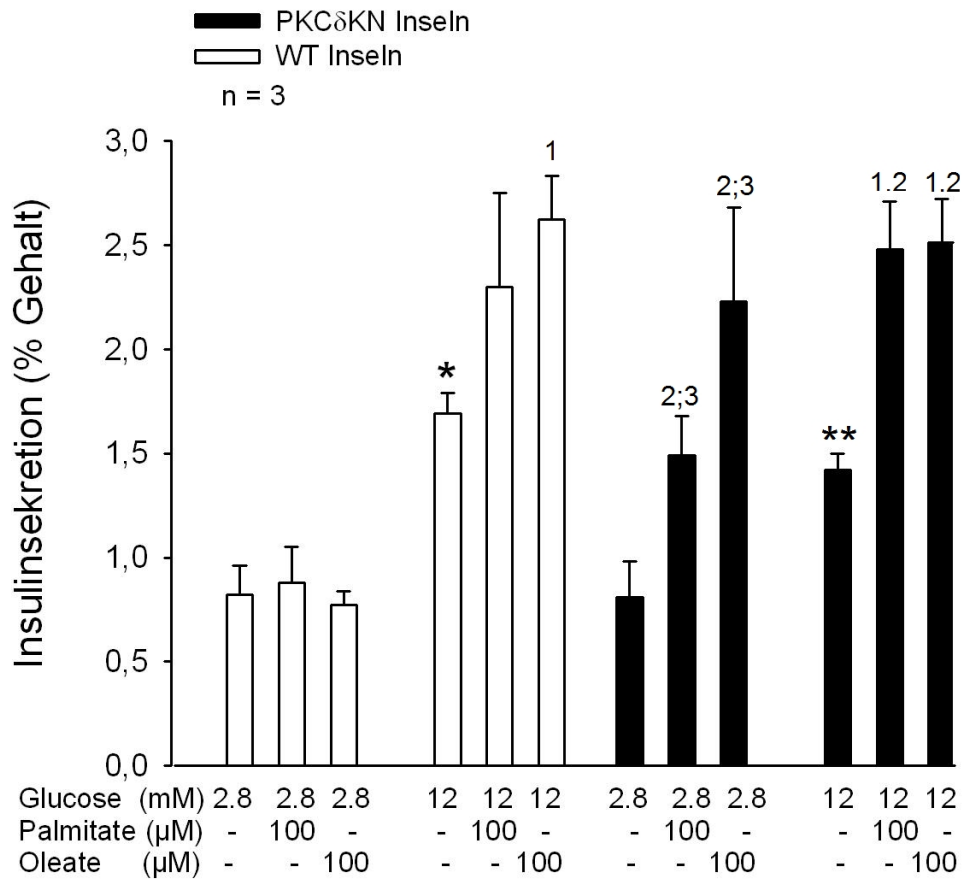


Abbildung 3.3: **Insulinsekretion nach Inkubation mit Fettsäuren**; Insulinmessung nach Inkubation für 1 h, \* = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der WT Inseln bei 2,8 mM, \*\* = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln bei 2,8 mM, 1 = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der WT Inseln bei 12 mM, 1.2 = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln bei 12 mM, 2 = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln bei 2,8 mM, 3 = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der WT Inseln nach Stimulation mit Palmitat/ Oleat, n = Anzahl der Versuche mit jeweils einer WT und einer PKC $\delta$ KN Maus.

2,5 % des Gehalts.

### 3.4 Insulinsekretion in WT und PKC $\delta$ KN Inseln bei Stimulation mit Carbachol und GPR40 Agonist

Um die Insulinsekretion der WT und der PKC $\delta$ KN Inseln weiter zu untersuchen wurde das sezernierte Insulin nach Inkubation mit Carbachol und TUG209, einem Agonisten des FFAR1, verglichen. Dadurch sollte die Stimulation der Insulinfreisetzung über den Weg der Phospholipase C Aktivierung in der  $\beta$ - Zelle, die zur Entstehung der second messenger IP<sub>3</sub> und DAG mit anschließender Calciumfreisetzung und PKC Aktivierung führt, zwischen den WT und den PKC $\delta$ KN Inseln verglichen werden. Außerdem sollte geklärt werden, ob PKC $\delta$ KN bei der rezept-

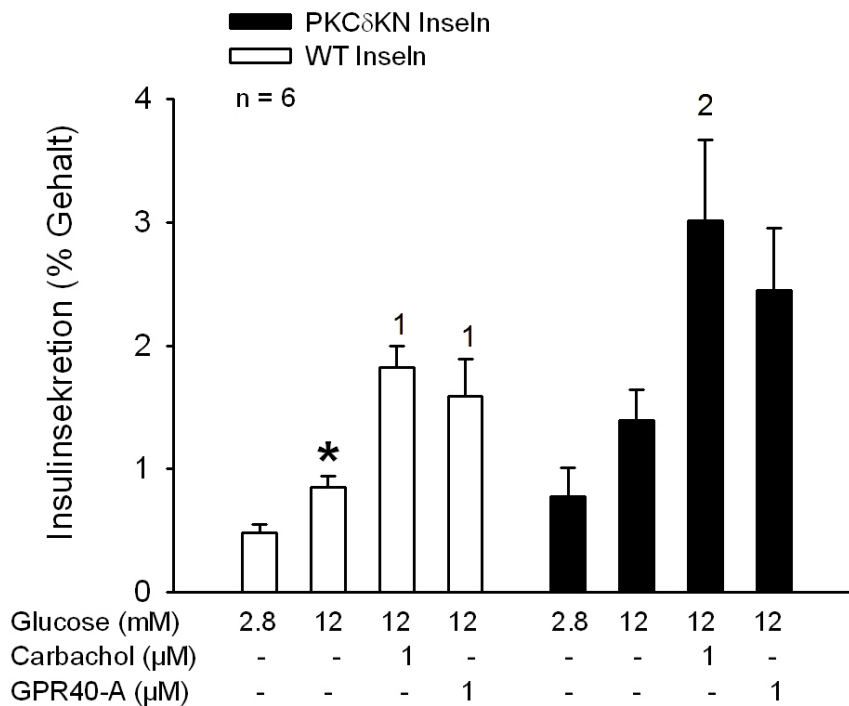


Abbildung 3.4: **Insulinsekretion nach Stimulation mit Carbachol und GPR 40 Agonist**; Messung der Insulinsekretion nach Inkubation für 1 h, \* = signifikant höhere Insulinsekretion gegenüber den WT Inseln bei 2,8 mM, 1 = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der WT Inseln bei 12 mM, 2 = signifikant Steigerung der Insulinsekretion gegenüber der Insulinsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln bei 12 mM, n = Anzahl der Versuche mit jeweils einer WT und einer PKC $\delta$ KN Maus.

toraktivierten Stimulation eine Rolle spielt. Die Inseln wurden dafür ebenfalls für

eine Stunde mit der Testsubstanz in Anwesenheit von 12 mM Glucose inkubiert. Die für diese Versuche verwendeten Mäuse waren zwischen 9 und 12 Monate alt. In Abbildung 3.4 erkennt man eine signifikante Stimulation der Insulinsekretion von WT Mausinseln durch 12 mM Glucose. Die Insulinsekretion bei 2,8 mM und 12 mM Glucose der KN Inseln war etwas höher als die der WT Inseln, aber wie auch schon in Abbildung 3.1 nicht signifikant gesteigert.

Carbachol stimuliert die Insulinsekretion sowohl in WT als auch in PKC $\delta$ KN Inseln signifikant. Dabei kommt es durch Carbachol zu einer maximalen Insulinsekretion in den WT Inseln von 2 % des Gehalts und in den PKC $\delta$ KN Inseln zu 3 % des Gehalts. TUG209 hat ebenfalls beide Inseltypen deutlich zur Insulinsekretion angeregt, aber nur bei den WT Inseln ist der Unterschied zwischen der Inkubation mit dem FFAR Agonist gegenüber der Inkubation in 12 mM Glucose signifikant höher. Insgesamt ist die Insulinsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln höher als die der WT Inseln. Dies gilt für die basale und die stimulierte Sekretion.

### 3.5 Insulingehalt der WT und PKC $\delta$ KN Mäuse

Um zu untersuchen, ob unterschiedliche Insulinsekretion durch unterschiedlichen Insulingehalt der Inseln erklärt werden kann, wurde der Insulingehalt der Inseln bestimmt. Abbildung 3.5 zeigt deutlich, dass der Insulingehalt der Inseln vom Alter der Mäuse abhängig ist und dass es zwischen den WT und den PKC $\delta$ KN Inseln keine Unterschiede im Insulingehalt gibt. In junge Mäuse findet man etwa 200 ng Insulin pro 5 Insel, in den älteren Mäusen allerdings schon 500 ng pro 5 Inseln.

### 3.6 Immunhistochemie

Um zu untersuchen, ob PKC $\delta$  einen Einfluss auf die  $\beta$ - Zellmasse hat wurden im zweiten Teil dieser Arbeit die Menge der insulinsezernierenden Zellen im Pankreas bestimmt. Hierfür wurde die Größe einzelner Inseln, die immunhistochemisch für Insulin angefärbt worden sind, in situ auf semidünnen Pankreasschnitten ausgemessen. Da jeder zehnte Schnitt, das heißt alle 100  $\mu$ m in die Auswertung einfließen, wird angenommen, dass jede Insel mindestens einmal ausgemessen wurde.

Da PKC $\delta$  mit HFD induzierter Glucoseintoleranz in Verbindung gebracht wird, sollte auch der Einfluss von Fetten in der Nahrung auf die  $\beta$ - Zellmasse untersucht werden. Zu diesem Zwecke wurden Mäuse für acht Wochen mit einer HFD

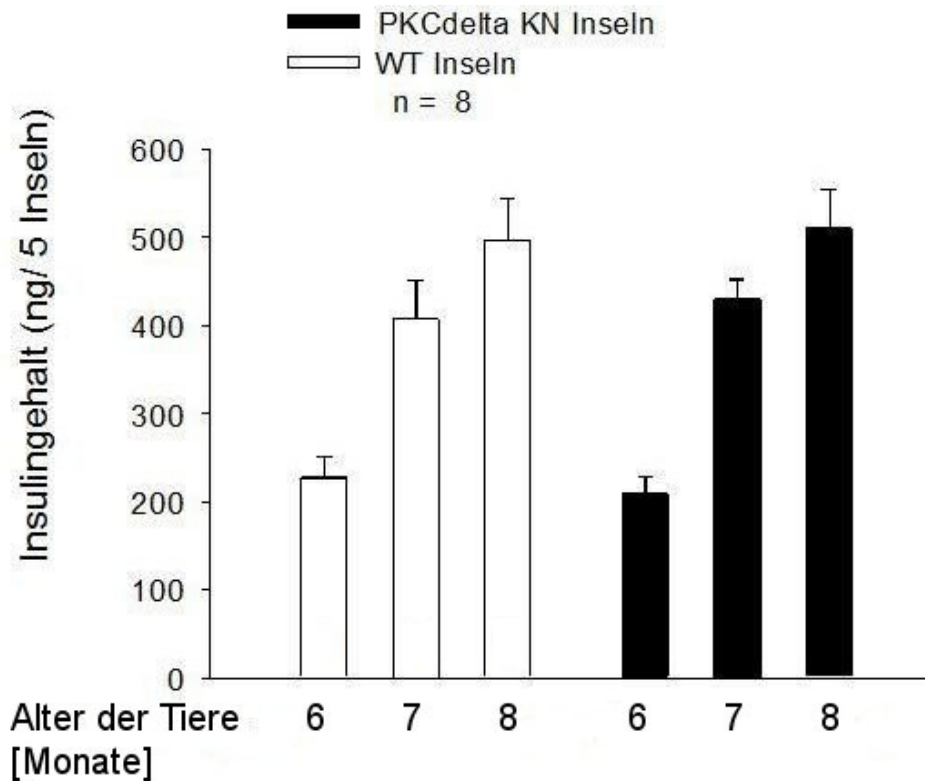


Abbildung 3.5: **Insulingehalt der WT und PKC $\delta$ KN Inseln**; Messung des Insulingehaltes nach Extraktion des intrainsulären Insulin durch sauren Ethanol mit ELISA, n = Anzahl der Versuche mit jeweils einer WT und einer PKC $\delta$ KN Maus.

gefüttert und dann immunhistologisch untersucht.

WT und PKC $\delta$ KN Mäuse nach normaler Fütterung im Alter von 16 Monaten und WT und PKC $\delta$ tgWT Mäuse nach fettreicher Fütterung im Alter von 4 Monaten wurden in diesem zweiten Teil der Arbeit untersucht.

### 3.6.1 Immunhistochemischer Insulinnachweis nach normaler Diät der Mäuse

Die Abbildungen 3.6 und 3.7 zeigen zum einen exemplarisch Inseln aus den Schnitten, die aus WT Mäusen angefertigt wurden und zum anderen Inseln aus PKC $\delta$ KN Mäusen, jeweils nach normaler Fütterung.

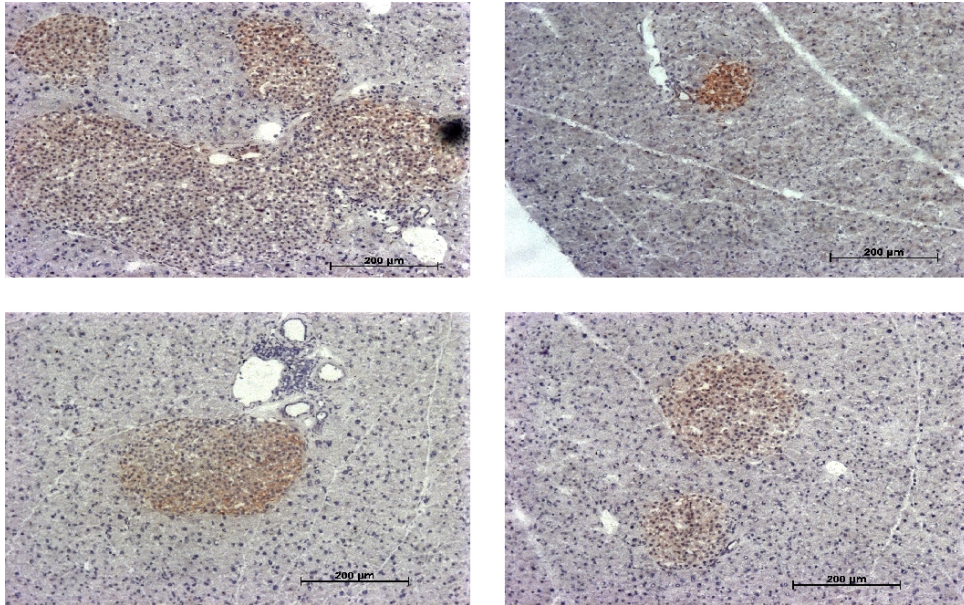


Abbildung 3.6: **Inseln der WT Mäuse nach normaler Diät**; dargestellt durch anti-Insulin Färbung und Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

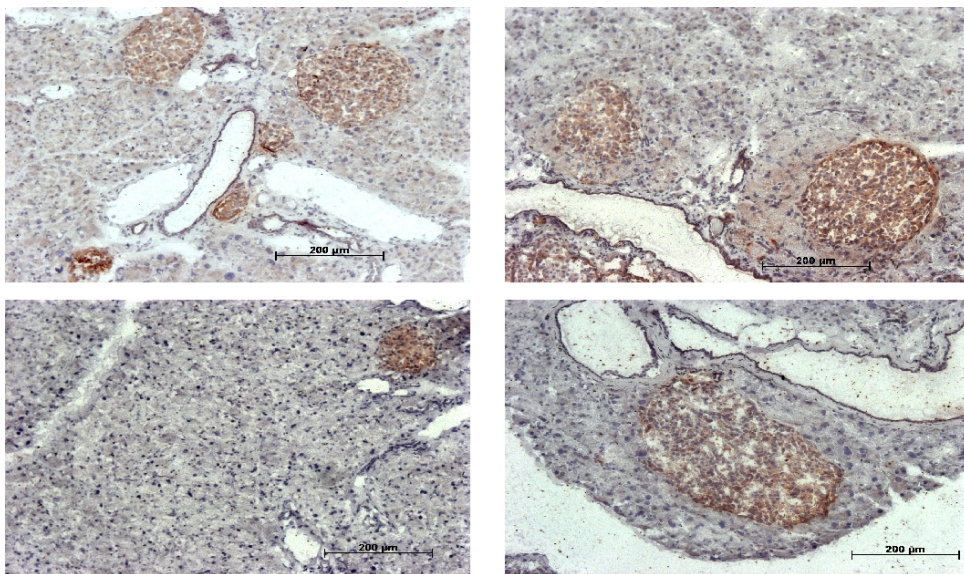


Abbildung 3.7: **Inseln der PKC $\delta$ KN Mäuse nach normaler Diät**; Darstellung mit anti- Insulin Färbung und Hämatoxylin Gegenfärbung.

### 3.6.2 Insulin positive Fläche ( $\beta$ - Zellmasse) im gesamten Gewebe nach normaler Diät der Mäuse

Um zu analysieren ob die Inselgröße und Verteilung der Inseln unter den Mäusen Unterschiede zeigt, wurden die Inseln ausgemessen und die Inselgrößen zwischen den WT und den PKC $\delta$ KN Mäusen mit normaler Diät verglichen. Dafür

wurden die Inseln in Gruppen von kleinen ( $\leq 4000 \mu\text{m}^2$ ) Inseln, mittleren Inseln zwischen  $4000\text{-}12\,000 \mu\text{m}^2$  und großen Inseln ( $\geq 12\,000 \mu\text{m}^2$ ) unterteilt. Diese Unterteilung soll die Größenverteilung besser veranschaulichen. Außerdem wurden prozentuale Verteilungen der Inseln in diesen drei Gruppen verglichen.

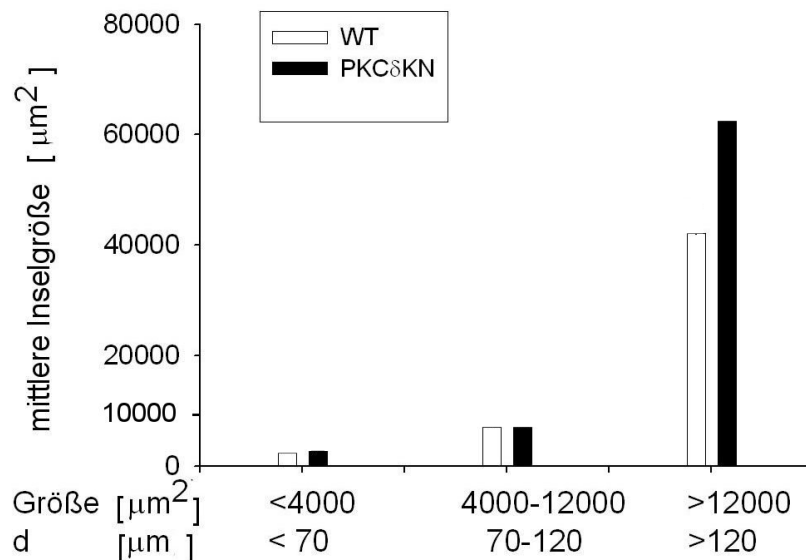


Abbildung 3.8: **Inselverteilung nach Größe nach normaler Diät**; 143 Inseln WT, 111 Inseln PKC $\delta$ KN aus je 2 Mäusen (n= 2), d= Durchmesser der Inseln.

Wie in Abbildungen 3.8 und 3.9 zu sehen ist, sind die meisten Inseln, sowohl aus den WT wie auch aus den PKC $\delta$ KN Mäusen, unter normaler Diät mit einer Größe von bis zu  $60\,000 \mu\text{m}^2$  deutlich in die Gruppe der großen Inseln einzuordnen. Bei den PKC $\delta$ KN sind circa 95 % der Inseln über  $12\,000 \mu\text{m}^2$  groß und nur etwa 5 % sind in der mittelgroßen Gruppe. Kleine Inseln  $\leq 4000 \mu\text{m}^2$  gibt es fast keine. Unter den Inseln der WT Mäuse finden sich etwa 85 % in der großen Gruppe und etwa 10 % in der mittleren Größenordnung. Nur ungefähr 5 % der Inseln sind kleiner als  $4000 \mu\text{m}^2$ .

Im Vergleich von WT Inseln mit PKC $\delta$ KN Inseln stellt man fest, dass die Inseln der WT Mäuse etwas kleiner sind. PKC $\delta$ KN Mäuse besitzen mehr größere Inseln als WT Mäuse. In der Tat erreichen die Inseln von PKC $\delta$ KN Mäusen eine maximale Größe von bis zu  $60\,000 \mu\text{m}^2$  bei den WT Inseln wurden dahingegen nur Inseln bis zu einer Größe von circa  $40\,000 \mu\text{m}^2$  erreicht.

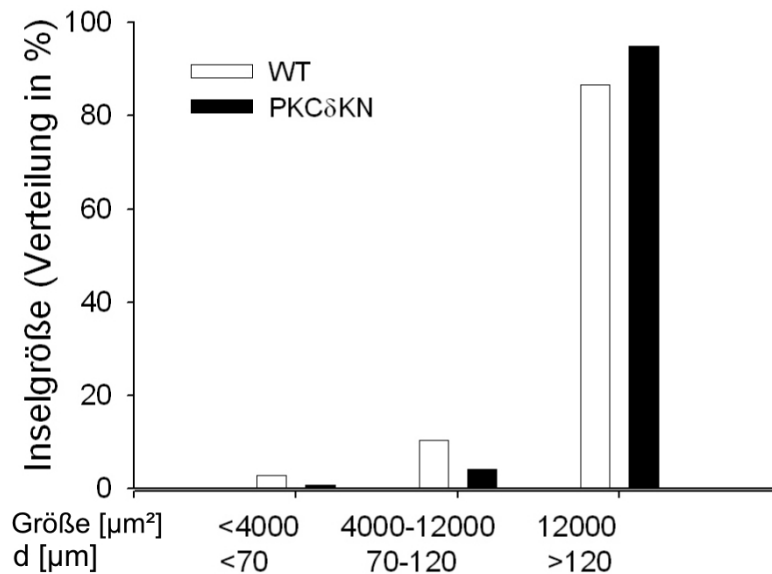


Abbildung 3.9: **Prozentuale Inselverteilung nach normaler Diät**; 143 Inseln WT, 111 Inseln PKC $\delta$ KN aus je 2 Mäusen (n= 2), d = Durchmesser der Inseln.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass PKC $\delta$ KN Mäuse größere Inseln ausbilden.

Was sicherlich bei dieser Feststellung zu bedenken ist, ist das mit 16 Monaten schon recht hohe Alter der PKC $\delta$ KN Mäuse. Vor allem wenn man davon ausgeht, dass die Inselgröße mit dem Alter der Tiere zunimmt, was durch den mit dem Alter ebenfalls steigenden Insulingehalt nahe gelegt wird.

### 3.6.3 Inselfläche im Bezug zur Pankreasgesamtfläche nach normaler Diät der Mäuse

Ob die Tatsache, dass PKC $\delta$ KN Mäuse größere Inseln ausbilden auch bedeutet, dass im Gesamtorgan mehr Inselfläche vorhanden ist, wurde durch die Ermittlung des prozentualen Anteils der Inselfläche am Gesamtpankreas ermittelt.

In der Tat zeigt Abbildung 3.10, dass die insulinpositive Fläche in den PKC $\delta$ KN Mäusen mit 0,8 % der Gesamtfläche größer ist als in den WT Mäusen, in denen nur 0,6 % der Gesamtfläche Inselfläche ist. Dies bestätigt die Vermutung, dass die PKC $\delta$ KN Mäuse größere Inseln als die WT Mäuse besitzen. Insgesamt muss man feststellen, dass die Inselfläche aber in beiden Mäusen relativ gering ist, wenn man von normalerweise 1-2% Inselmasse im gesamten Pankreas ausgeht



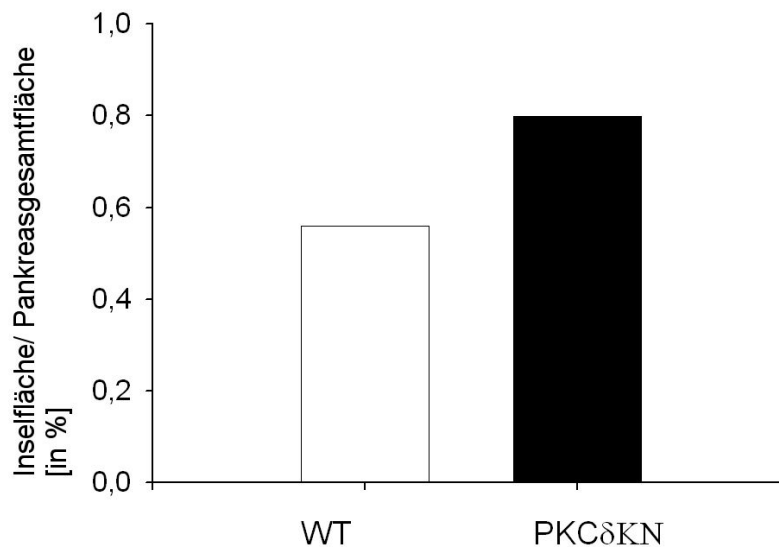


Abbildung 3.10: **Inselfläche im Bezug zur Pankreasfläche insgesamt nach normaler Diät**; 143 Inseln WT in 19 ausgemessenen Schnitten, 111 Inseln PKC $\delta$ KN in 17 ausgemessenen Schnitten; aus je 2 Mäusen (n= 2).

[3].

### 3.6.4 Immunhistochemischer Insulinnachweis nach HFD der Mäuse

Die Abbildungen 3.11 und 3.12 zeigen exemplarisch Inseln aus den WT und den PKC $\delta$ tgWT Mäusen nach der achtwöchigen Fütterung mit „High Fat Diet“.

### 3.6.5 Insulin positive Fläche ( $\beta$ - Zellmasse) im gesamten Gewebe nach HFD der Mäuse

Abschließend wurde untersucht, in wie weit HFD die Größe der Inseln in WT und PKC $\delta$ KN Mäusen unterschiedlich beeinflusst. Da angenommen wird, dass PKC $\delta$  HFD induzierte Abnahme der  $\beta$ - Zellmasse mitverursacht, wurden nun PKC $\delta$ tgWT exprimierende Pankreata untersucht. Ebenso wie bei den Gewebeschnitten der Mäuse nach normaler Diät, wurden hier die Inseln der Mäuse nach HFD Fütterung durch das Ausmessen in die entsprechenden Gruppen, kleine ( $\leq 4000 \mu\text{m}^2$ ) Inseln, mittlere Inseln zwischen  $4000\text{-}12\ 000 \mu\text{m}^2$

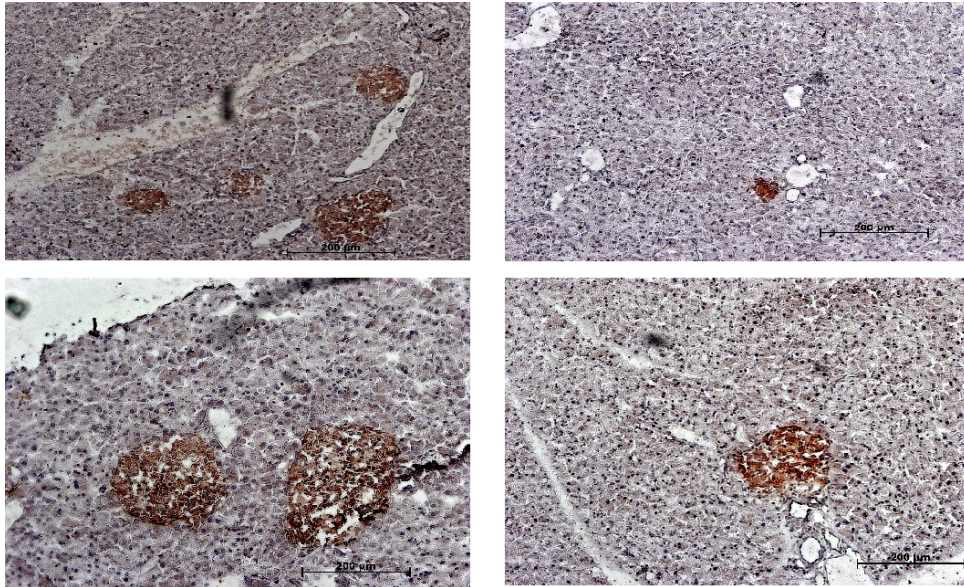


Abbildung 3.11: **Inseln der WT Mäuse nach HFD**; Darstellung mit anti- Insulin Färbung und Hämatoxylin Gegenfärbung.

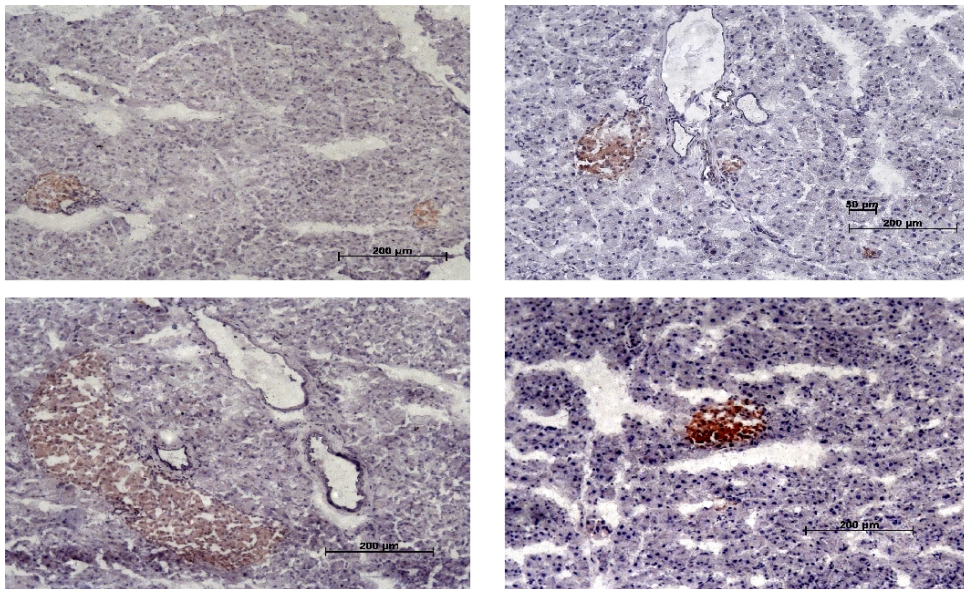


Abbildung 3.12: **Inseln der PKC $\delta$ tgWT Mäuse nach HFD**; dargestellt durch anti- Insulin Färbung und Hämatoxylin Gegenfärbung.

und große Inseln ( $\geq 12\,000\ \mu\text{m}^2$ ) unterteilt um die Größenverteilung besser veranschaulichen zu können.

In Abbildung 3.13 sieht man, dass die Inseln der WT Mäuse sich zu etwa jeweils 30 % in der Gruppe  $\leq 4000\ \mu\text{m}^2$  und in der Gruppe  $\geq 12\,000\ \mu\text{m}^2$  finden. Mit einem Anteil von 40 % sind die meisten Inseln in der mittleren Gruppe zu finden. Bei den PKC $\delta$ tgWT Mäusen liegen mit knapp 40 % ebenfalls die meisten Inseln

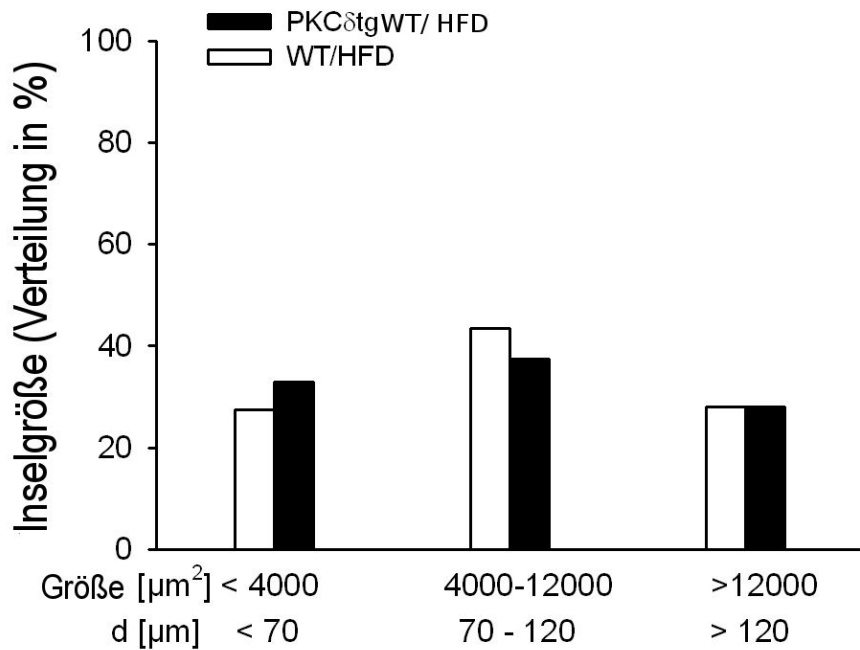
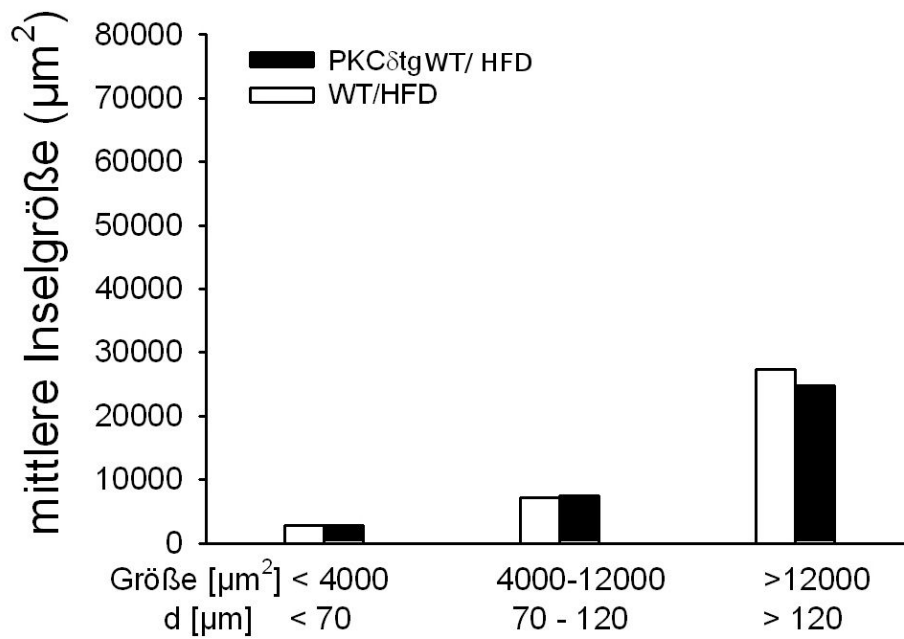


Abbildung 3.13: **Inselverteilung nach Größe und prozentuale Verteilung der Inseln nach HFD**; 144 Inseln WT, 138 Inseln PKC $\delta$ tgWT aus je 2 Mäusen (n= 2), d= Durchmesser der Inseln.

in der mittleren Gruppe. Etwa 35 % finden sich in der Gruppe  $\leq 4000 \mu\text{m}^2$  und der geringste Anteil findet sich in der Gruppe  $\geq 12\,000 \mu\text{m}^2$ .

Die WT Inseln erreichen eine maximale Größe von bis zu  $28\,000 \mu\text{m}^2$ , die PKC $\delta$ tgWT Inseln nur bis zu  $25\,000 \mu\text{m}^2$ .

Die Mäuse nach „High Fat Diet“ haben insgesamt deutlich kleinere Inseln als die Mäuse nach normaler Fütterung. Finden sich nach normalem Futter fast alle Inseln in der großen Gruppe  $\geq 12\,000 \mu\text{m}^2$ , sind die Inselgrößen nach HFD deutlich breiter gestreut und die Mehrzahl findet sich in der mittleren Gruppe. Dies Tatsache, dass die PKC $\delta$ tgWT Inseln vor allem in der mittleren und der kleinen Gruppe zu finden sind, lassen vermuten, dass es durch Expression von PKC $\delta$ tgWT zu einer vermehrten Apoptose und damit zur Schrumpfung der Inseln kommt. Die große Anzahl kleiner Inseln könnte auf eine vermehrte Neogenese von Inseln, induziert durch die HFD, hinweisen.

### 3.6.6 Inselfläche im Bezug zur Pankreasgesamtfläche nach HFD der Mäuse

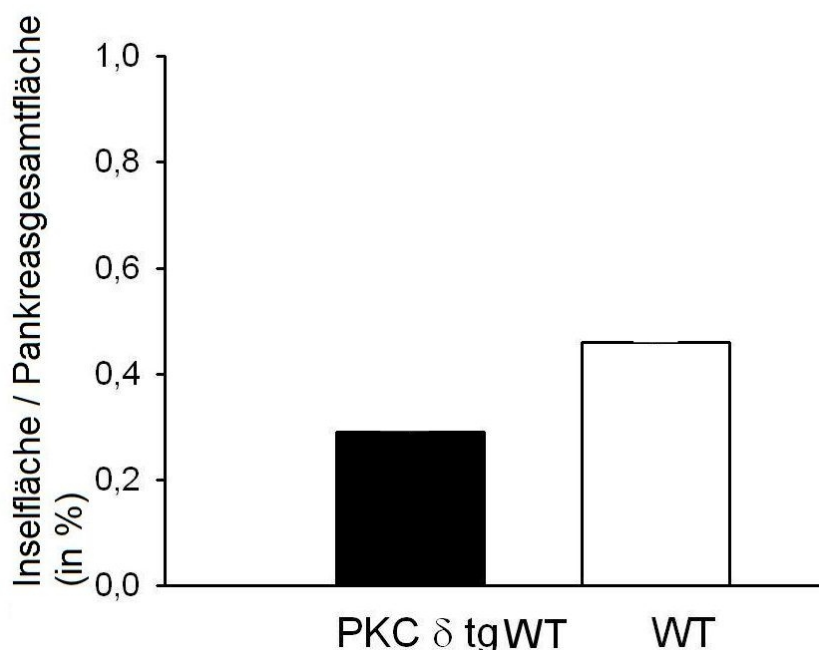


Abbildung 3.14: **Inselfläche im Bezug zur Pankreasfläche insgesamt nach HFD**; 144 Inseln WT in 12 ausgemessenen Schnitten, 138 Inseln PKC $\delta$ tgWT in 12 ausgemessenen Schnitten; aus je 2 Mäusen (n= 2).

Um die gesamte Inselmasse abschätzen zu können, wurde die insulinpositive Fläche hier ebenfalls in Bezug zu der Gesamtfläche des Pankreasgewebe gesetzt. Dies zeigt, wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist, dass die WT Mäuse doch mehr Inselmasse als die PKC $\delta$ tgWT Mäuse besitzen. Die WT Mäuse zeigen bei etwa 0,5 % der Gesamtfläche eine insulinpositive Färbung. Die PKC $\delta$ tgWT Mäuse dahingegen nur bei etwa 0,3 %.

Vergleicht man die prozentuale Inselfläche zwischen WT Inseln nach Kontrolldiät und nach HFD, so hat sich die Inselzellmasse nicht verändert. Allerdings kann man festhalten, dass die PKC $\delta$ KN Inseln größer und die PKC $\delta$ tgWT Inseln kleiner als die entsprechenden WT Inseln sind, was dafür spricht, dass eine vermehrte Aktivität der PKC $\delta$  zu einer Veränderung der  $\beta$ - Zellmasse führt.

# 4 Diskussion

## 4.1 Die Rolle der PKC $\delta$ in der Insulinsekretion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Insulinsekretion isolierter Langerhans'scher Inseln aus WT und PKC $\delta$ KN Mäusen an Hand verschiedener Stimulationen untersucht.

In der Glucose stimulierten Insulinsekretion kann man durchweg eine Mehrsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln gegenüber den WT Inseln feststellen. Bei allen Glucosekonzentrationen sezernieren die PKC $\delta$ KN Inseln mehr Insulin als die WT Inseln. Allerdings ist der Unterschied nicht immer signifikant.

In den Stimulationsversuchen mit PMA und Forskolin kommt es zu einer maximalen Insulinsekretion von etwa 7 % des Gehalts sowohl in den WT als auch den PKC $\delta$ KN Inseln. Dies heisst, dass die maximale Sekretion durch die Expression von PKC $\delta$ KN nicht gestört ist. In den Stimulationen mit Fettsäuren, Carbachol und TUG209 sezernieren die PKC $\delta$ KN Inseln ebenfalls durchweg etwas mehr Insulin als die WT Inseln. Allerdings ist dieser Unterschied auch hier nicht immer signifikant.

Dies deutet an, dass die Expression von PKC $\delta$ KN keinen entscheidenden Einfluss auf die Insulinsekretion hat. Im Widerspruch dazu konnten Uchida und Mitarbeiter in PKC $\delta$  Null Mäusen eine reduzierte Insulinsekretion feststellen, was mit einer reduzierte Munc-18 Phosphorylierung korreliert war [81]. Dies könnte eine reduzierte Insulinexozytose in PKC $\delta$  -/- Mäusen andeuten [81].

In unserer Arbeitsgruppe konnte des Weiteren gezeigt werden, dass PKC $\delta$ KN Mäuse in vivo erhöhte Insulinspiegel aufweisen und gegenüber HFD induzierter Glucoseintoleranz geschützt sind [35]. Dies steht ebenfalls im Widerspruch zu den Ergebnissen von Uchida und Mitarbeitern, die in PKC $\delta$  Null Mäusen eine verminderte Glucosetoleranz aufzeigen konnten [81]. Eine Erklärungsmöglichkeit dieser differierenden Ergebnisse, besteht darin, dass die Mäuse unserer Arbeitsgruppe nur in den  $\beta$ - Zellen des Pankreas keine funktionsfähige PKC $\delta$  exprimieren, während die PKC $\delta$  Nullmäuse bei Uchida und Mitarbeitern in allen Geweben keine PKC $\delta$  besitzen, was zu Interaktionen führen kann.

Unsere Daten stehen im Einklang mit verschiedenen Studien, in denen keine Translokation von PKC $\delta$  als Zeichen der Aktivierung, als Reaktion auf Glucose, festgestellt wurde [90], [47], [66], was eine Rolle der PKC $\delta$  in der Glucose- induzier-

ten Insulinsekretion ausschließt. Auch Carpenter und Mitarbeiter konnten in der durch PMA induzierten Insulinsekretion keine Bedeutung für die PKC $\delta$  aufzeigen, sondern nur eine Rolle für PKC $\alpha$  belegen [12].

Die Insulinsekretion in den Glucose- induzierten Sekretionsstudien scheint aber auch vom verwendeten BSA abhängig zu sein. Dies lässt vermuten, dass die im BSA Fraktion V enthaltenen Fettsäuren die Insulinsekretion der Inseln vielleicht beeinflussen. Insbesondere scheint BSA Fraktion V die basale Insulinantwort niedrig zu halten.

Um den Einfluss von Fettsäuren auf die Insulinsekretion näher zu untersuchen wurden die Inkubationen der Inseln mit Palmitat und Oleat, TUG209 (GW9508) sowie im Vergleich mit Carbachol durchgeführt, da TUG209 und Carbachol beide einen PLC abhängigen Signalweg aktivieren. Die Carbachol stimulierte Insulinsekretion führte sowohl bei den WT als auch bei den PKC $\delta$ KN Inseln zu einer signifikanten Steigerung der Insulinsekretion und auch die Stimulation mit TUG209 potenzierte die Insulinsekretion beider Inseltypen. Insgesamt war die Insulinsekretion in den PKC $\delta$ KN Inseln sowohl basal als auch stimuliert etwas höher als in den WT Inseln.

Die Palmitat und Oleat abhängige Insulinsekretion zeigt bei hoher Glucose in beiden Inseltypen eine vergleichbare Sekretionssteigerung. Allerdings fällt auf, dass bei niedriger Glucose nur in den PKC $\delta$ KN Inseln eine Steigerung der Insulinsekretion durch die Fettsäuren statt findet, wohingegen in den WT Inseln keine Reaktion auf die Fettsäuren zu beobachten ist. Dies lässt vermuten, dass die PKC $\delta$  die FFAR- induzierte Insulinsekretion bei niedriger Glucose hemmend beeinflusst.

Besonders fällt auf, dass der Insulingehalt in den WT und den PKC $\delta$ KN Inseln annähernd gleich ist, obwohl die PKC $\delta$ KN Inseln, wenn auch nicht signifikant, so doch etwas mehr Insulin als die WT Inseln sezernieren. Dies macht deutlich, dass vermehrte Insulinspeicherung in den PKC $\delta$ KN Inseln nicht die Ursache der Sekretionsunterschiede sind. Bei diesem Punkt kommen Uchida und Mitarbeiter zum gleichen Ergebnis, denn auch sie können in den PKC $\delta$ -/- Mäusen keinen veränderten Insulingehalt der Inseln feststellen [81]. Außerdem kann man feststellen, dass der Insulingehalt vom Alter der Mäuse abhängig ist. Je älter die untersuchten Mäuse waren, desto größer war der Gehalt an Insulin in den Inseln. In Tieren im Alter von 8 Monaten wurden bis zu 100 ng Insulin/ Insel gemessen (siehe Abbildung 3.5), was den Schluss nahe legt, dass der Insulingehalt und damit wahrscheinlich die Inselgröße mit dem Alter der Mäuse zunimmt.

Sicherlich ist auch zu bedenken, dass für die Sekretionsversuche relativ alte

Mäuse benutzt wurden. Die relativ schlechte Glucose- induzierte Insulinsekretion könnte dementsprechend über eine altersbedingte Glucoseunempfindlichkeit erklärt werden. Eine altersbedingte Glucoseintoleranz konnte in den PKC $\delta$ KN Mäusen nicht verhindert werden [35]. Auch in PKC $\delta$  knockout Mäusen wurde schon im Alter von 20 Wochen eine altersabhängige Glucoseintoleranz berichtet [81]. Zusammenfassend kann man sagen, dass die PKC $\delta$  nur einen geringen Einfluss auf die Insulinsekretion hat. Die Hemmung der PKC $\delta$  scheint aber zu einer Sekretionssteigerung vor allem bei niedrigen Glucosekonzentrationen zu führen. Allerdings ist sowohl die maximale Sekretion als auch die FFAR abhängige Sekretion durch die Hemmung der PKC $\delta$  unverändert. Da der Insulingehalt der Inseln keine Unterschiede aufweist, ist die Ursache der Sekretionsunterschiede nicht in einer stärkeren Insulinspeicherung der PKC $\delta$ KN Inseln zu suchen. Man kann spekulieren, dass eventuell durch die Hemmung der endogenen PKC $\delta$  die Insulinfreisetzung, zum Beispiel die Exozytose erleichtert wird, vor allem bei niedriger Glucose. Dies steht allerdings im Gegensatz zu voraus gehenden Untersuchungen, die gezeigt haben, dass in Mäusen, die keine PKC $\delta$  exprimieren die Insulinsekretion auf Grund verminderter Exozytose reduziert ist [81].

## 4.2 Die PKC $\delta$ in der Regulation der Inselmasse

In 16 Monate alten Mäusen, die mit Standarddiät gefüttert worden waren, waren 85 % der Inseln größer als 12 000  $\mu\text{m}^2$ . Die Inseln der PKC $\delta$ KN Mäuse waren sogar nochmals größer, denn hier waren 95 % der Inseln größer als 12 000  $\mu\text{m}^2$ . Mit bis zu maximal 60 000  $\mu\text{m}^2$  finden sich in den PKC $\delta$ KN Mäusen sehr große Inseln. Vor allem durch den Bezug zum gesamten Pankreasgewebe fällt auf, dass die PKC $\delta$ KN Mäuse mehr insulinpositive Fläche als die WT Mäuse besitzen. Interessanter Weise finden sich unter normaler Fütterung kaum mittel große oder kleine Inseln. Dies lässt den Schluss zu, dass während des Alterns die Inselzellen nicht zu Grunde gehen, sondern proliferieren und immer größer werden. Die Beobachtung, dass PKC $\delta$ KN größere Inseln ausbilden als WT Mäuse, wird zusätzlich durch die Tatsache unterstützt, dass auch die gesamte Inselfläche in PKC $\delta$ KN größer als im WT Pankreas ist.

Nach HFD kann man zwischen den WT und den PKC $\delta$ tgWT Inseln nur geringe Unterschiede ausmachen. Aber es scheint so, als wären die Inseln der WT Mäuse insgesamt mit bis zu 30 000  $\mu\text{m}^2$  etwas größer als die transgenen Inseln. Vergleicht man aber die Inselmasse im Bezug zur gesamten Pankreasfläche so wird tatsächlich deutlich, dass die WT Mäuse mit 0,4 % Inselanteil mehr Insel-



masse als die PKC $\delta$ tgWT Mäuse (0,3 %) haben. Diesen Unterschied könnte auf die Überexpression von PKC $\delta$  in den transgenen Mäusen zurückgeführt werden. Insgesamt stellt man fest, dass die PKC $\delta$ tgWT Inseln nach Fettfütterung kleiner als die entsprechenden WT Inseln sind. Die PKC $\delta$ KN Inseln nach normaler Fütterung sind deutlich größer als die entsprechenden WT Inseln. Des Weiteren zeigt sich im Vergleich der WT Inseln nach den beiden unterschiedlichen Fütterungen, dass die Inseln der WT Mäuse nach normaler Diät circa 0,6 % der gesamten Pankreasfläche ausmachen und nach HFD nur noch 0,4 % der Gesamtfläche. Auch die maximal gemessene Inselgröße sinkt in den WT Mäusen in Abhängigkeit von der fettreichen Nahrung von 40 000  $\mu\text{m}^2$  auf 30 000  $\mu\text{m}^2$ . Diese Differenzen könnte man zum einen auf die Fette in der Nahrung zurück führen, was zeigen würde, dass übermäßiger Fettgehalt der Nahrung unabhängig von der Expression von PKC $\delta$  auch schon zu einer Reduzierung der Inselgröße führen kann. Dies könnte zum Beispiel durch eine Steigerung der Apoptose und damit verbundener Schrumpfung der Inseln einher gehen. Allerdings muss man andererseits das Alter der WT Mäuse in den Experimenten beachten. So waren die WT Mäuse, die HFD erhielten 4 Monate alt. Die Mäuse mit normaler Fütterung allerdings 16 Monate. Dieser Altersunterschied könnte ebenfalls ein Grund für die Größendifferenz der Inseln sein. Wenn man, wie es der Insulingehalt (siehe Abbildung 3.5) andeutet, davon ausgeht, dass die Inselgröße dieser Mäuse physiologisch mit dem Alter zunimmt.

Die PKC $\delta$ KN exprimierenden Mäuse waren zwar ebenfalls 16 Monate und die PKC $\delta$ tgWT Mäuse erst 4 Monate alt, aber die sehr deutlichen Unterschiede in der  $\beta$ - Zellmasse, lassen sich hier nicht alleine auf das Alter zurück führen. Da die proapoptotische Wirkung von PKC $\delta$  schon vielfach gezeigt wurde [51], [56],[69] und [96] und auch ein Zusammenhang zwischen Apoptose von  $\beta$ - Zellen und PKC $\delta$  nachgewiesen wurde [11], ist es gut möglich, dass die veränderte Inselgröße, die in diesen Studien beobachtet wurde auf eine PKC $\delta$  abhängige Apoptosesteigerung zurück zu führen ist.

Die Apoptosemessung anhand immunhistochemischem Nachweis gespaltener Caspase 3 zeigt in der Tat eine erhöhte Apoptoserate in WT aber nicht in PKC $\delta$ KN Mausinseln nach HFD. In isolierten Inselzellen war ebenfalls die Palmitat- induzierte Apoptose durch PKC $\delta$ KN Expression gehemmt [35]. Diese Beobachtungen bestätigen, dass PKC $\delta$  in insulinsezernierenden Zellen eine pro- apoptotische Rolle spielen kann und auch in der Fettsäure- abhängigen Apoptose eine Rolle zu spielen scheint.

In diesem Sinne lässt sich die Größenverteilung der Inseln nach HFD erklären.

Die größere Anzahl von mittleren Inseln und die kleine Anzahl von großen Inseln lässt auf eine erhöhte Apoptoserate schließen. Die größere Zahl kleiner Inseln nach HFD könnte auch mit einer vermehrten Neogenese begründet werden. Zusammenfassend gibt diese Studie Hinweise, dass die pro- apoptotische Kinase PKC $\delta$  hemmend auf die basale Insulinsekretion und stimulierend auf die HFD- und Fettsäure- abhängige Apoptose wirkt. Die damit verbundene Verkleinerung der  $\beta$ - Zellmasse könnte an der Entstehung eines Adipositas- abhängigen Diabetes mellitus Typ 2 beteiligt sein.

## 5 Zusammenfassung

Die Erkrankung Diabetes mellitus Typ 2 ist eine weltweit anzutreffende Stoffwechselstörung, die auf Grund von Insulinresistenz in der Peripherie und  $\beta$ -Zelldysfunktion zur chronischen Hyperglykämie führt. Als Folge dessen kommt es zu mikro- und makrovasculären Schäden, die zu erheblichen Folgen, wie zum Beispiel Myokardinfarkt oder zerebralem Insult führen können. In Kombination mit Hypertonie und Adipositas, sowie Mikroalbuminurie und Hyperurikämie zählt man Diabetes mellitus Typ 2 zum Formenkreis des Metabolischen Syndroms.

Die Proteinkinase C  $\delta$  gehört zur Gruppe der neuen PKCs, die durch Diacylglycerin aber nicht durch Calcium aktiviert werden können. Sie ist, wie alle Proteinkinasen der Familie, eine Serin/ Threonin Kinase, fällt aber dadurch unter den Isoformen auf, dass sie im Gegensatz zu den anderen pro- apoptotische Wirkungen zeigt. Dies konnte in vielen verschiedenen Studien belegt werden. Auch in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas wird eine Beteiligung der PKC $\delta$  an der Apoptose vermutet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sie durch Fettsäuren direkt aktivierbar ist und für den apoptotischen Zelltod verantwortlich zu sein scheint. Allerdings zeigte eine andere Studie, dass die Runterregulierung der PKC $\delta$  durch langandauernde Behandlung mit dem Phorbolster PMA, nicht vor der Fettsäuren- induzierten Apoptose schützt. Des Weiteren wurde in PKC $\delta$   $-/-$  Mäusen gezeigt, dass die Mäuse eine reduzierte Insulinsekretion haben und im Alter glucoseintolerant werden. Diese widersprüchlichen Beobachtungen führten zu der Frage, ob die PKC $\delta$  Einfluss auf die Entstehung von Adipositas- abhängigem Diabetes mellitus Typ 2 hat, ob sie zu Veränderungen in der  $\beta$ - Zelle führt, die regelrechte Insulinsekretion beeinflusst oder stört und ob sie adaptive Veränderungen im Pankreas insgesamt und speziell auch nach fettreicher Nahrung beeinflusst.

Diese Fragen sollten in der vorliegenden Studie anhand von PKC $\delta$  transgenen Mäusen geklärt werden. Dazu wurden zwei transgene Mäuse generiert. Die eine weist eine Überexpression der Wildtyp PKC $\delta$  im Pankreas auf (PKC $\delta$ tgWT) und die andere exprimiert eine funktionslose Kinase im Pankreas, die zu einer kompetitiven Hemmung der endogenen PKC $\delta$  führt (PKC $\delta$ KN).

Zuerst wurde in diesen Studien die Rolle der PKC $\delta$  in der Insulinsekretion untersucht. Dafür wurden Inseln aus Wildtyp und PKC $\delta$  Kinase negativen Mäusen isoliert und dann mit verschiedenen Glucosekonzentrationen, beziehungsweise unter Zugabe verschiedener Testsubstanzen inkubiert. Glucose verdoppelte die

Insulinsekretion in WT und in PKC $\delta$ KN Inseln. Zum einen fiel auf, dass die Sekretion von PKC $\delta$ KN Inseln konstant höher war als von WT Inseln, zum anderen war die basale Sekretion in PKC $\delta$ KN Inseln in Anwesenheit von fettsäurefreiem BSA erhöht im Gegensatz zu BSA, welches nicht fettsäurefrei war. Die Inkubation der Inseln in 100 nM PMA oder 5  $\mu$ M Forskolin stimulierte die Insulinsekretion siebenfach, aber zwischen den WT und den PKC $\delta$ KN Inseln konnte kein signifikanter Sekretionsunterschied festgestellt werden. Diese Beobachtung erlaubt die Schlussfolgerung, dass PKC $\delta$ KN die maximal stimulierbare Sekretion nicht beeinflusst und möglicherweise insbesondere keine direkte regulatorische Wirkung auf die cAMP- und PKC- stimulierte Insulinsekretion hat.

Die Insulinsekretion nach Inkubation in 100  $\mu$ M der gesättigten Fettsäure Palmitat oder der einfach ungesättigten Fettsäure Oleat, zeigte vor allem für Oleat aber auch für Palmitat eine Sekretionssteigerung sowohl der WT als auch der PKC $\delta$ KN Inseln bei hoher Glucose. So führte Palmitat zu einer Sekretion von 2,25 % des Gehaltes in den WT Inseln im Vergleich zu 1,75 % Sekretion ohne Zugabe der Fettsäure. In den PKC $\delta$ KN Inseln steigerte Palmitat die Sekretion sogar von 1,5 % auf 2,5 % des Gehaltes. Oleat induzierte sowohl in den WT als auch den PKC $\delta$ KN Inseln ebenfalls eine Sekretionssteigerung. Interessanterweise stimulierten die Fettsäuren bei niedriger Glucose nur in den transgenen Inseln, wobei Palmitat zu einer 1,5- fachen und Oleat zu einer verdoppelten Sekretion führte. Die WT Inseln zeigten bei niedriger Glucose weder auf Palmitat noch auf Oleat eine Sekretionssteigerung. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass PKC $\delta$  auf die Insulinsekretion bei niedriger Glucose unterdrückend wirkt.

Um abschließend noch den Weg der PLC Aktivierung genauer zu untersuchen, wurden Inseln mit 1  $\mu$ M Carbachol oder 1  $\mu$ M TUG209, einem GPR40- Rezeptor Agonisten stimuliert. Diese Versuche zeigten in den PKC $\delta$ KN Inseln ebenfalls eine stärkere Insulinsekretion als in den WT Inseln und außerdem fiel wiederum in den PKC $\delta$ KN Inseln eine höhere basale Insulinsekretion auf.

Der Vergleich des Insulingehaltes der Inseln zeigte für die WT und die PKC $\delta$ KN Inseln fast identische Werte. Außerdem wurde deutlich, dass der Insulingehalt vom Alter der Mäuse abhängt. So enthalten Inseln aus 6 Monate alten Mäusen etwa 40 ng Insulin, 8 Monate alte aber schon 100 ng Insulin. Daraus kann man ableiten, dass die Ursache der gesteigerten Insulinsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln nicht mit einem veränderten Insulingehalt zu erklären ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Inselmasse immunhistochemisch in situ bestimmt. Dafür wurden die Pankreata der Mäuse entnommen, Gefrierschnitte angefertigt und diese mit einem Anti- Insulin Antikörper behandelt. Die Inselgröße

wurde biometrisch ausgemessen, analysiert und in Bezug zur gesamten Größe des Pankreas gesetzt. Um außerdem den Einfluss einer hohen Fettdiät auf die  $\beta$ -Zellmasse zu klären, wurde die Inselfläche nach achtwöchiger Fettfütterung von Mäusen ebenfalls histologisch untersucht.

Nach normalem Futter konnte man feststellen, dass die PKC $\delta$ KN Mäuse größere Inseln als die WT Mäuse besitzen. Dies konnte auch im Bezug zur Pankreasgesamtfläche nachgewiesen werden. Die PKC $\delta$ KN Inseln waren mit bis zu 60 000  $\mu\text{m}^2$  teilweise sehr groß und bei einer Einteilung der Inseln in Gruppen  $<4000 \mu\text{m}^2$ , zwischen 4000- 12 000  $\mu\text{m}^2$  und  $>12\ 000 \mu\text{m}^2$  fanden sich fast alle Inseln (95 %) der PKC $\delta$ KN Mäuse in der größten Gruppe, während 85 % der WT Inseln zu den größten Inseln zählten. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Sekretionsunterschiede in vivo in den Mäusen darstellen. Wenn die PKC $\delta$ KN Inseln deutlich größer sind als die der WT Mäuse, können sie mehr Insulin sezernieren. Als mögliche Erklärung der Größenzunahme der PKC $\delta$ KN Inseln kommt eine Hemmung der Apoptose in Betracht. Da für die PKC $\delta$  schon vielfach ihre pro-apoptotische Wirkung gezeigt worden ist und bekannt ist, dass sie auch in  $\beta$ -Zellen Apoptose auslösen kann, ist die Hemmung der Apoptose durch die Kinase negative Mutante und dadurch vergrößerte Inseln eine mögliche Erklärung für die größeren Inseln bei Überexpression von PKC $\delta$ KN.

Nach der HFD fiel auf, dass sowohl die WT als auch die PKC $\delta$ tgWT Mäuse deutlich kleinere Inseln aufwiesen, als nach normalem Futter. Die meisten Inseln fanden sich hier in der mittleren Gruppe und mit circa 30% befanden sich auch deutlich mehr Inseln in der Gruppe der kleinen Inseln. Die WT Inseln lagen beim Vergleich mit den PKC $\delta$ tgWT Inseln im Bezug zur Gesamtfläche des Pankreas mit 0,4% etwas besser als die PKC $\delta$ tgWT Inseln mit nur 0,3% Anteil an der Gesamtfläche. Insgesamt war der Anteil der  $\beta$ -Zellmasse an der Gesamtfläche des Pankreas nach HFD kleiner als nach normaler Diät. Diese Hypothese wurde in unserer Arbeitsgruppe nochmals bestätigt. In Schnitten von WT Mäusen wurde nach HFD signifikant mehr gespaltene Caspase 3 nachgewiesen, nicht aber in PKC $\delta$ KN Pankreasschnitten. Ebenso konnte Palmitat-induzierte Apoptose in WT Inselzellen, nicht aber in PKC $\delta$ KN Inselzellen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass eine Hemmung der PKC $\delta$  Aktivität vor Fettsäuren- und HFD-induzierter Fehlfunktion schützt. Dabei hat PKC $\delta$ KN weniger einen stimulierenden Effekt auf die Insulinsekretion, sondern stabilisiert eher die  $\beta$ -Zellmasse, indem PKC $\delta$ KN den apoptotischen Zelltod hemmt.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	<b>Schema der PKC<math>\delta</math></b> ; von R. Lehmann, Med. Klinik IV, Tübingen; V1- V5= variable Regionen; C1, C3, C4 = konstante Regionen; PS = Pseudosubstrat. . . . .	26
2.1	<b>Nachweis von PKC<math>\delta</math></b> ; Überexpression der WT Kinase in Inseln aus PKC $\delta$ tgWT Mäusen und starker Expression der funktionslosen Kinase aus PKC $\delta$ KN Mäusen von A. Hennige, Med. Klinik IV, Tübingen. . . . .	36
2.2	<b>Gewichtsverlauf während der hohen Fettdiät</b> ; Messungen an je 2 WT und 2 PKC $\delta$ tgWT Mäusen, Messungen von A. Hennige, Med. Klinik IV, Tübingen. . . . .	38
2.3	<b>Blutglucoseverlauf während der hohen Fettdiät</b> ; Messungen an je 2 WT und 2 PKC $\delta$ tgWT Mäusen, Messungen A. Hennige, Med. Klinik IV, Tübingen. . . . .	39
2.4	<b>Nachweis von endogener und transgener PKC<math>\delta</math> aus Schwanzspitzen</b> ; Mäuse 2, 5, 7, 9 und 10 sind WT, Mäuse 1, 3, 4, 6, 8 und 11 sind transgene Mäuse, tg = transgen, co= Positivkontrolle; von A. Hennige, Med. Klinik IV, Tübingen. . . . .	40
3.1	<b>Glucose- induzierte Insulinsekretion in WT und PKC<math>\delta</math>KN Inseln</b> ; Insulinmessung nach Inkubation für 1 h, obere Abb. nach Inkubation mit fettsäurefreiem BSA, untere Abb.: BSA Fraktion V, * = signifikant gegenüber der Sekretion der WT Inseln bei 2,8 mM, ** = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln bei 2,8 mM, 1 = signifikant gegenüber dem Wert der WT Inseln, n = Anzahl der Versuche mit jeweils einer WT und einer PKC $\delta$ KN Maus. . . . .	55
3.2	<b>Insulinsekretion nach Stimulation mit Forskolin und PMA</b> ; Insulinmessung nach Inkubation für 1 h, n = Anzahl der Versuche mit je einer WT und einer PKC $\delta$ KN Maus. . . . .	56
3.3	<b>Insulinsekretion nach Inkubation mit Fettsäuren</b> ; Insulinmessung nach Inkubation für 1 h, * = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der WT Inseln bei 2,8 mM, ** = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln bei 2,8 mM, 1 = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der WT Inseln bei 12 mM, 1.2 = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln bei 12 mM, 2 = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln bei 2,8 mM, 3 = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der WT Inseln nach Stimulation mit Palmitat/ Oleat, n = Anzahl der Versuche mit jeweils einer WT und einer PKC $\delta$ KN Maus. . . . .	58

3.4	<b>Insulinsekretion nach Stimulation mit Carbachol und GPR 40 Agonist</b> ; Messung der Insulinsekretion nach Inkubation für 1 h, * = signifikant höhere Insulinsekretion gegenüber den WT Inseln bei 2,8 mM, 1 = signifikant gegenüber der Insulinsekretion der WT Inseln bei 12 mM, 2 = signifikant Steigerung der Insulinsekretion gegenüber der Insulinsekretion der PKC $\delta$ KN Inseln bei 12 mM, n = Anzahl der Versuche mit jeweils einer WT und einer PKC $\delta$ KN Maus.	59
3.5	<b>Insulingehalt der WT und PKC<math>\delta</math>KN Inseln</b> ; Messung des Insulingehaltes nach Extraktion des intrainsulären Insulin durch sauren Ethanol mit ELISA, n = Anzahl der Versuche mit jeweils einer WT und einer PKC $\delta$ KN Maus.	61
3.6	<b>Inseln der WT Mäuse nach normaler Diät</b> ; dargestellt durch anti-Insulin Färbung und Gegenfärbung mit Hämatoxylin.	62
3.7	<b>Inseln der PKC<math>\delta</math>KN Mäuse nach normaler Diät</b> ; Darstellung mit anti- Insulin Färbung und Hämatoxylin Gegenfärbung.	62
3.8	<b>Inselverteilung nach Größe nach normaler Diät</b> ; 143 Inseln WT, 111 Inseln PKC $\delta$ KN aus je 2 Mäusen (n= 2), d= Durchmesser der Inseln.	63
3.9	<b>Prozentuale Inselverteilung nach normaler Diät</b> ; 143 Inseln WT, 111 Inseln PKC $\delta$ KN aus je 2 Mäusen (n= 2), d = Durchmesser der Inseln.	64
3.10	<b>Inselfläche im Bezug zur Pankreasfläche insgesamt nach normaler Diät</b> ; 143 Inseln WT in 19 ausgemessenen Schnitten, 111 Inseln PKC $\delta$ KN in 17 ausgemessenen Schnitten; aus je 2 Mäusen (n= 2).	65
3.11	<b>Inseln der WT Mäuse nach HFD</b> ; Darstellung mit anti- Insulin Färbung und Hämatoxylin Gegenfärbung.	66
3.12	<b>Inseln der PKC<math>\delta</math>tgWT Mäuse nach HFD</b> ; dargestellt durch anti-Insulin Färbung und Hämatoxylin Gegenfärbung.	66
3.13	<b>Inselverteilung nach Größe und prozentuale Verteilung der Inseln nach HFD</b> ; 144 Inseln WT, 138 Inseln PKC $\delta$ tgWT aus je 2 Mäusen (n= 2), d= Durchmesser der Inseln.	67
3.14	<b>Inselfläche im Bezug zur Pankreasfläche insgesamt nach HFD</b> ; 144 Inseln WT in 12 ausgemessenen Schnitten, 138 Inseln PKC $\delta$ tgWT in 12 ausgemessenen Schnitten; aus je 2 Mäusen (n= 2).	68

# Tabellenverzeichnis

2.1	Hanks- Lösung 4-fach konzentriert . . . . .	42
2.2	Präparierlösung A/ Hanks Lösung einfach konzentriert . . . . .	42
2.3	Präparierlösung B/ Hanks Lösung mit BSA . . . . .	42
2.4	Kollagenaselösung . . . . .	43
2.5	Kulturmedium . . . . .	43
2.6	Konzentrat 1 (mixed salts) . . . . .	44
2.7	Konzentrat 2 (NaCl/NaHCO <sub>3</sub> ) . . . . .	44
2.8	Inkubationslösung gebrauchsfertig/ Krebs- Ringer Puffer . . . . .	44
2.9	PBS 10-fach konzentriert . . . . .	51



# Literaturverzeichnis

- [1] International diabetes federation (<http://www.eatlas.idf.org>).
- [2] P.-H. Althoff, J.E.Altwein, W.Bachmann, K.Badenhoop, T. Baehring, E.Biermann, H. Böhles, B.O.Böhm, J.E. Bojunga, N.Bornfeld, R.Dikow, F.W. Dittmar, S.Eberl, U.R. Fölsch, B.Gallwitz, Th.Haak, H.-U. Häring, H. Hasche, M. Haslbeck, H.Hauner, E. Haupt, H.Helbig, K.D.Hepp, J.E.Herwig, B. Hillebrand, M.Hummel, H.-U.Janka, A.Joussen, R.Kaufmann, M.Kellerer, F.-U.Keuler, T.Koschinsky, W.Landgraf, H.Laube, K.D.Lemmen, N.Lotz, S.Martin, H.Mehnert, D.Pauleikhoff, R.Petzoldt, A.Pistorius, K.Rett, E.Ritz, Ch.Rosak, L.Schaaf, W.A.Scherbaum, O.Schnell, F.Schulz, P.-M.Schumm-Draeger, J.Seißler, W. Spuck, E.Standl, R.Standl, H.Stiegler, F.Strian, M.Toeller-Suchan, D.Tschöpe, K.-H.Usadel, S.Waad, H.Walter, M.Wickelmayr, B.Willershausen-Zönnchen, A.-G.Ziegler, and D.Ziegler. *Diabetologie in Klinik und Praxis*. 5. Auflage, S. 63- 313. Georg Thieme Verlag, 2003.
- [3] G. Arnold, H.M.Beier, M.Herrmann, P.Kaufmann, H.-J.Kretschmann, W.Kühnel, T.H.Schiebler, W.Schmidt, B.Steiniger, J.Winckler, E.van der Zypen, and K.Zilles. *Anatomie*. 8.Auflage, S.576- 580. Springer-Verlag, Berlin, 2002.
- [4] F. M. Ashcroft. K(atp) channels and insulin secretion: a key role in health and disease. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 2):243–246, Apr 2006.
- [5] Diana Avram, Felicia Ranta, Anita M Hennige, Susanne Berchtold, Sabine Hopp, Hans-Ulrich Häring, Florian Lang, and Susanne Ullrich. Igf-1 protects against dexamethasone-induced cell death in insulin secreting ins-1 cells independent of akt/pkb phosphorylation. *Cell Physiol Biochem*, 21(5-6):455–462, 2008.
- [6] Jeff W Barclay, Tim J Craig, Richard J Fisher, Leonora F Ciuffo, Gareth J O Evans, Alan Morgan, and Robert D Burgoyne. Phosphorylation of munc18 by protein kinase c regulates the kinetics of exocytosis. *J Biol Chem*, 278(12):10538–10545, Mar 2003.
- [7] Michal Blass, Ilana Kronfeld, Gila Kazimirsky, Peter M Blumberg, and Chaya Brodie. Tyrosine phosphorylation of protein kinase c delta is essential for its apoptotic effect in response to etoposide. *Mol Cell Biol*, 22(1):182–195, Jan 2002.
- [8] Celia P Briscoe, Mohammad Tadayyon, John L Andrews, William G Benson, Jon K Chambers, Michelle M Eilert, Catherine Ellis, Nabil A Elshourbagy, Aaron S Goetz, Dana T Minnick, Paul R Murdock, Howard R Sauls, Usman Shabon, Lisa D Spinage, Jay C Strum, Philip G Szekeres, Kong B Tan, James M Way, Diane M Ignar, Shelagh Wilson, and Alison I Muir. The orphan

g protein-coupled receptor gpr40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*, 278(13):11303–11311, Mar 2003.

- [9] Anna K Busch, Ebru Gurisik, Damien V Cordery, Michelle Sudlow, Gareth S Denyer, D. Ross Laybutt, William E Hughes, and Trevor J Biden. Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearoyl coenzyme a desaturase protects pancreatic beta-cells from lipoapoptosis. *Diabetes*, 54(10):2917–2924, Oct 2005.
- [10] L. Carpenter, D. Cordery, and T. J. Biden. Protein kinase c delta activation by interleukin-1beta stabilizes inducible nitric-oxide synthase mrna in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, 276(7):5368–5374, Feb 2001.
- [11] Lee Carpenter, Damien Cordery, and Trevor J Biden. Inhibition of protein kinase c delta protects rat ins-1 cells against interleukin-1beta and streptozotocin-induced apoptosis. *Diabetes*, 51(2):317–324, Feb 2002.
- [12] Lee Carpenter, Christopher J Mitchell, Zheng Z Xu, Philip Poronnik, Gerald W Both, and Trevor J Biden. Pkc alpha is activated but not required during glucose-induced insulin secretion from rat pancreatic islets. *Diabetes*, 53(1):53–60, Jan 2004.
- [13] Elisabeth Christiansen, Christian Urban, Nicole Merten, Kathrin Liebscher, Kasper K Karlsen, Alexandra Hamacher, Andreas Spinrath, Andrew D Bond, Christel Drewke, Susanne Ullrich, Matthias U Kassack, Evi Kostenis, and Trond Ulven. 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*, 51(22):7061–7064, Nov 2008.
- [14] Danuta Cieslak and Antigone Lazou. Regulation of bad protein by pka, pkc-delta and phosphatases in adult rat cardiac myocytes subjected to oxidative stress. *Mol Cells*, 24(2):224–231, Oct 2007.
- [15] R. V. Considine, M. R. Nyce, L. E. Allen, L. M. Morales, S. Triester, J. Serrano, J. Colberg, S. Lanza-Jacoby, and J. F. Caro. Protein kinase c is increased in the liver of humans and rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus: an alteration not due to hyperglycemia. *J Clin Invest*, 95(6):2938–2944, Jun 1995.
- [16] J. E. de Vries, M. M. Vork, T. H. Roemen, Y. F. de Jong, J. P. Cleutjens, G. J. van der Vusse, and M. van Bilsen. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res*, 38(7):1384–1394, Jul 1997.
- [17] M. F. Denning, A. A. Dlugosz, D. W. Threadgill, T. Magnuson, and S. H. Yuspa. Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase c delta. *J Biol Chem*, 271(10):5325–5331, Mar 1996.

- [18] Tracie A DeVries, Rachelle L Kalkofen, Angela A Matassa, and Mary E Reyland. Protein kinase c delta regulates apoptosis via activation of stat1. *J Biol Chem*, 279(44):45603–45612, Oct 2004.
- [19] Tracie A DeVries, Margaret C Neville, and Mary E Reyland. Nuclear import of pkcdelta is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence. *EMBO J*, 21(22):6050–6060, Nov 2002.
- [20] Tracie A DeVries-Seimon, Angela M Ohm, Michael J Humphries, and Mary E Reyland. Induction of apoptosis is driven by nuclear retention of protein kinase c delta. *J Biol Chem*, 282(31):22307–22314, Aug 2007.
- [21] M. H. Disatnik, G. Buraggi, and D. Mochly-Rosen. Localization of protein kinase c isozymes in cardiac myocytes. *Exp Cell Res*, 210(2):287–297, Feb 1994.
- [22] Heike Döppler and Peter Storz. A novel tyrosine phosphorylation site in protein kinase d contributes to oxidative stress-mediated activation. *J Biol Chem*, 282(44):31873–31881, Nov 2007.
- [23] G. Drews. *Comprehensive Human Physiology, Vol.2, Chapter Endocrine Pancreas*. S. 1345-1368. Springer-Verlag, Berlin, 1996.
- [24] Daniel J Drucker. Glucagon-like peptide-1 and the islet beta-cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Endocrinology*, 144(12):5145–5148, Dec 2003.
- [25] Mathilde Dubois, Pierre Vacher, Benoît Roger, Deborah Huyghe, Brigitte Vandewalle, Julie Kerr-Conte, François Pattou, Naima Moustaid-Moussa, and Jochen Lang. Glucotoxicity inhibits late steps of insulin exocytosis. *Endocrinology*, 148(4):1605–1614, Apr 2007.
- [26] Katrin Eitel, Harald Staiger, Johannes Rieger, Harald Mischak, Heide Brandhorst, Mathias D Brendel, Reinhard G Bretzel, Hans-Ulrich Häring, and Monika Kellerer. Protein kinase c delta activation and translocation to the nucleus are required for fatty acid-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *Diabetes*, 52(4):991–997, Apr 2003.
- [27] Wissal El-Assaad, Jean Buteau, Marie-Line Peyot, Christopher Nolan, Raphael Roduit, Serge Hardy, Erik Joly, Ghassan Dbaibo, Lawrence Rosenberg, and Marc Prentki. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology*, 144(9):4154–4163, Sep 2003.
- [28] Y. Emoto, Y. Manome, G. Meinhardt, H. Kasaki, S. Kharbanda, M. Robertson, T. Ghayur, W. W. Wong, R. Kamen, and R. Weichselbaum. Proteolytic activation of protein kinase c delta by an ice-like protease in apoptotic cells. *EMBO J*, 14(24):6148–6156, Dec 1995.

- [29] Robert V Farese, Mini P Sajan, and Mary L Standaert. Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase c and protein kinase b/akt): actions and defects in obesity and type ii diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230(9):593–605, Oct 2005.
- [30] E. Ferrannini. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev*, 19(4):477–490, Aug 1998.
- [31] Mónica George, Eduard Ayuso, Alba Casellas, Cristina Costa, Jean Christophe Devedjian, and Fatima Bosch. Beta cell expression of igf-i leads to recovery from type 1 diabetes. *J Clin Invest*, 109(9):1153–1163, May 2002.
- [32] Michael W Greene, Nick Morrice, Robert S Garofalo, and Richard A Roth. Modulation of human insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by protein kinase cdelta. *Biochem J*, 378(Pt 1):105–116, Feb 2004.
- [33] M. Gschwendt, W. Kittstein, and F. Marks. A novel type of phorbol ester-dependent protein phosphorylation in the particulate fraction of mouse epidermis. *Biochem Biophys Res Commun*, 137(2):766–774, Jun 1986.
- [34] Anita M Hennige, Andreas Fritsche, Volker Strack, Cora Weigert, Harald Mischak, Patricia Borboni, Walter Renn, Hans-Ulrich Häring, and Monika Kellerer. Pkc zeta enhances insulin-like growth factor 1-dependent mitogenic activity in the rat clonal beta cell line rin 1046-38. *Biochem Biophys Res Commun*, 290(1):85–90, Jan 2002.
- [35] Anita M Hennige, Felicia Ranta, Isabel Heinzelmann, Martina Düfer, Diana Michael, Heidi Braumüller, Stefan Z Lutz, Reiner Lammers, Gisela Drews, Fatima Bosch, Hans-Ulrich Häring, and Susanne Ullrich. Over-expression of kinase negative protein kinase cdelta in pancreatic beta-cells protects mice from diet-induced glucose intolerance and beta-cell dysfunction. *Diabetes*, Oct 2009.
- [36] Anita M Hennige, Norbert Stefan, Katja Kapp, Rainer Lehmann, Cora Weigert, Alexander Beck, Klaus Moeschel, Joanne Mushack, Erwin Schleicher, and Hans-Ulrich Häring. Leptin down-regulates insulin action through phosphorylation of serine-318 in insulin receptor substrate 1. *FASEB J*, 20(8):1206–1208, Jun 2006.
- [37] Florian Horn, Isabelle Mocand Nadine Schneider, Christian Grillhösel, Silke Berghold, and Gerd Lindenmeier. *Biochemie des Menschen, Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 3.Auflage S. 112- 471. Georg Thieme Verlag, 2005.
- [38] Miriam Horovitz-Fried, Tamar Brutman-Barazani, Dov Kesten, and Sanford R Sampson. Insulin increases nuclear protein kinase cdelta in l6 skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 149(4):1718–1727, Apr 2008.
- [39] June Chunqiu Hou, Le Min, and Jeffrey E Pessin. Insulin granule biogenesis, trafficking and exocytosis. *Vitam Horm*, 80:473–506, 2009.

- [40] M. J. Humphries, A. M. Ohm, J. Schaack, T. S. Adwan, and M. E. Reyland. Tyrosine phosphorylation regulates nuclear translocation of pckdelta. *Oncogene*, 27(21):3045–3053, May 2008.
- [41] Yasuaki Itoh, Yuji Kawamata, Masataka Harada, Makoto Kobayashi, Ryo Fujii, Shoji Fukusumi, Kazuhiro Ogi, Masaki Hosoya, Yasuhiro Tanaka, Hiroshi Uejima, Hideyuki Tanaka, Minoru Maruyama, Rie Satoh, Shoichi Okubo, Hideki Kizawa, Hidetoshi Komatsu, Fumika Matsumura, Yuko Noguchi, Tokuyuki Shinohara, Shuji Hinuma, Yukio Fujisawa, and Masahiko Fujino. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through gpr40. *Nature*, 422(6928):173–176, Mar 2003.
- [42] Thomas Karow. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. S. 603- 604. Thomas Karow, 2006.
- [43] M. Kellerer, J. Mushack, E. Seffer, H. Mischak, A. Ullrich, and H. U. Häring. Protein kinase c isoforms alpha, delta and theta require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (hek 293 cells). *Diabetologia*, 41(7):833–838, Jul 1998.
- [44] Viktoria Kheifets, Rachel Bright, Koichi Inagaki, Deborah Schechtman, and Daria Mochly-Rosen. Protein kinase c delta (deltapkc)-annexin v interaction: a required step in deltapkc translocation and function. *J Biol Chem*, 281(32):23218–23226, Aug 2006.
- [45] H. King, R. E. Aubert, and W. H. Herman. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, 21(9):1414–1431, Sep 1998.
- [46] K. L. Knutson and M. Hoenig. Identification and subcellular characterization of protein kinase-c isoforms in insulinoma beta-cells and whole islets. *Endocrinology*, 135(3):881–886, Sep 1994.
- [47] K. L. Knutson and M. Hoenig. Regulation of distinct pools of protein kinase c delta in beta cells. *J Cell Biochem*, 60(1):130–138, Jan 1996.
- [48] A. S. Kraft, W. B. Anderson, H. L. Cooper, and J. J. Sando. Decrease in cytosolic calcium/phospholipid-dependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of el4 thymoma cells. *J Biol Chem*, 257(22):13193–13196, Nov 1982.
- [49] Calivarathan Latchoumycandane, Vellareddy Anantharam, Masashi Kitazawa, Yongjie Yang, Arthi Kanthasamy, and Anumantha G Kanthasamy. Protein kinase c delta is a key downstream mediator of manganese-induced apoptosis in dopaminergic neuronal cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 313(1):46–55, Apr 2005.

- [50] D. R. Laybutt, C. Schmitz-Peiffer, A. K. Saha, N. B. Ruderman, T. J. Biden, and E. W. Kraegen. Muscle lipid accumulation and protein kinase c activation in the insulin-resistant chronically glucose-infused rat. *Am J Physiol*, 277(6 Pt 1):E1070–E1076, Dec 1999.
- [51] L. Li, P. S. Lorenzo, K. Bogi, P. M. Blumberg, and S. H. Yuspa. Protein kinase cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol Cell Biol*, 19(12):8547–8558, Dec 1999.
- [52] W. Li, J. C. Yu, D. Y. Shin, and J. H. Pierce. Characterization of a protein kinase c-delta (pkc-delta) atp binding mutant. an inactive enzyme that competitively inhibits wild type pkc-delta enzymatic activity. *J Biol Chem*, 270(14):8311–8318, Apr 1995.
- [53] Zhixue Liu, Xia Liu, Keiichi I Nakayama, Keiko Nakayama, and Keqiang Ye. Protein kinase c-delta phosphorylates ebp1 and prevents its proteolytic degradation, enhancing cell survival. *J Neurochem*, 100(5):1278–1288, Mar 2007.
- [54] Kathrin Maedler, José Oberholzer, Pascal Bucher, Giatgen A Spinas, and Marc Y Donath. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes*, 52(3):726–733, Mar 2003.
- [55] Thomais Markou, Chee Shin Yong, Peter H Sugden, and Angela Clerk. Regulation of protein kinase c delta by phorbol ester, endothelin-1, and platelet-derived growth factor in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 281(13):8321–8331, Mar 2006.
- [56] A. A. Matassa, L. Carpenter, T. J. Biden, M. J. Humphries, and M. E. Reylan. Pkcdelta is required for mitochondrial-dependent apoptosis in salivary epithelial cells. *J Biol Chem*, 276(32):29719–29728, Aug 2001.
- [57] D. Mochly-Rosen. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*, 268(5208):247–251, Apr 1995.
- [58] D. Mochly-Rosen, C. J. Henrich, L. Cheever, H. Khaner, and P. C. Simpson. A protein kinase c isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell Regul*, 1(9):693–706, Aug 1990.
- [59] Y. Nishizuka. The role of protein kinase c in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308(5961):693–698, 1984.
- [60] Christopher J Nolan, Murthy S R Madiraju, Viviane Delghingaro-Augusto, Marie-Line Peyot, and Marc Prentki. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes*, 55 Suppl 2:S16–S23, Dec 2006.

- [61] Min-A. Oh, Eun-Sil Kang, Sin-Ae Lee, Eun-Ok Lee, Yong-Bae Kim, Sung-Hoon Kim, and Jung Weon Lee. Pkcdelta and cofilin activation affects peripheral actin reorganization and cell-cell contact in cells expressing integrin alpha5 but not its tailless mutant. *J Cell Sci*, 120(Pt 15):2717–2730, Aug 2007.
- [62] Sten Orrenius. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett*, 149(1-3):19–23, Apr 2004.
- [63] K. Paz, R. Hemi, D. LeRoith, A. Karasik, E. Elhanany, H. Kanety, and Y. Zick. A molecular basis for insulin resistance. elevated serine/threonine phosphorylation of irs-1 and irs-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 272(47):29911–29918, Nov 1997.
- [64] Melanie Peterhoff, Andrea Sieg, Marc Brede, Cho-Ming Chao, Lutz Hein, and Susanne Ullrich. Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in alpha2-adrenoceptor knockout mice. *Eur J Endocrinol*, 149(4):343–350, Oct 2003.
- [65] Paolo Pinton, Sara Leo, Mariusz R Wieckowski, Giulietta Di Benedetto, and Rosario Rizzuto. Long-term modulation of mitochondrial ca<sup>2+</sup> signals by protein kinase c isozymes. *J Cell Biol*, 165(2):223–232, Apr 2004.
- [66] Paolo Pinton, Takashi Tsuboi, Edward K Ainscow, Tullio Pozzan, Rosario Rizzuto, and Guy A Rutter. Dynamics of glucose-induced membrane recruitment of protein kinase c beta ii in living pancreatic islet beta-cells. *J Biol Chem*, 277(40):37702–37710, Oct 2002.
- [67] Felicia Ranta, Diana Avram, Susanne Berchtold, Martina Düfer, Gisela Drews, Florian Lang, and Susanne Ullrich. Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4. *Diabetes*, 55(5):1380–1390, May 2006.
- [68] R. Regazzi, G. Li, S. Ullrich, C. Jaggi, and C. B. Wollheim. Different requirements for protein kinase c activation and ca<sup>2+</sup>-independent insulin secretion in response to guanine nucleotides. endogenously generated diacylglycerol requires elevated ca<sup>2+</sup> for kinase c insertion into membranes. *J Biol Chem*, 264(17):9939–9944, Jun 1989.
- [69] M.E. Reyland. Protein kinase Cdelta and apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.*, 35:1001–1004, Nov 2007.
- [70] R.Greger. *Comprehensive Human Physiology: From Cellular Mechanisms to Integration*. S. 183- 187. Sringerverlag Berlin, 1996.
- [71] Christopher J Rhodes. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science*, 307(5708):380–384, Jan 2005.

- [72] Vitalyi O Rybin, Jianfen Guo, Zoya Gertsberg, Hasnae Elouardighi, and Susan F Steinberg. Protein kinase cepsilon (pkcepsilon) and src control pkcdelta activation loop phosphorylation in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 282(32):23631–23638, Aug 2007.
- [73] Vitalyi O Rybin, Jianfen Guo, Zoya Gertsberg, Steven J Feinmark, and Susan F Steinberg. Phorbol 12-myristate 13-acetate-dependent protein kinase c delta-tyr311 phosphorylation in cardiomyocyte caveolae. *J Biol Chem*, 283(26):17777–17788, Jun 2008.
- [74] C. Schmitz-Peiffer, C. L. Browne, N. D. Oakes, A. Watkinson, D. J. Chisholm, E. W. Kraegen, and T. J. Biden. Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase c isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. *Diabetes*, 46(2):169–178, Feb 1997.
- [75] Carsten Schmitz-Peiffer and Trevor J Biden. Protein kinase c function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. *Diabetes*, 57(7):1774–1783, Jul 2008.
- [76] Carsten Schmitz-Peiffer, D. Ross Laybutt, James G Burchfield, Ebru Gurisik, Sakura Narasimhan, Christopher J Mitchell, David J Pedersen, Uschi Braun, Gregory J Cooney, Michael Leitges, and Trevor J Biden. Inhibition of pkcepsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance. *Cell Metab*, 6(4):320–328, Oct 2007.
- [77] Zsolt Szígyártó, Kornélia Szucs, Ildikó Kovács, Róza Zákány, Sándor Sipka, and Pál Gergely. The role of protein kinase c isoenzymes in the regulation of calcineurin activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Mol Med*, 20(3):359–364, Sep 2007.
- [78] Shinji Takai, Rie Matsushima-Nishiwaki, Haruhiko Tokuda, Eisuke Yasuda, Hidenori Toyoda, Yuji Kaneoka, Akihiro Yamaguchi, Takashi Kumada, and Osamu Kozawa. Protein kinase c delta regulates the phosphorylation of heat shock protein 27 in human hepatocellular carcinoma. *Life Sci*, 81(7):585–591, Jul 2007.
- [79] Y. Takai, A. Kishimoto, M. Inoue, and Y. Nishizuka. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. i. purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem*, 252(21):7603–7609, Nov 1977.
- [80] A. Trümper, K. Trümper, and D. Hörsch. Mechanisms of mitogenic and anti-apoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in beta(ins-1)-cells. *J Endocrinol*, 174(2):233–246, Aug 2002.
- [81] Toyoyoshi Uchida, Noseki Iwashita, Mica Ohara-Imaizumi, Takeshi Ogihara, Shintaro Nagai, Jong Bock Choi, Yoshifumi Tamura, Norihiro Tada, Ryuzo Kawamori, Keiichi I Nakayama, Shinya Nagamatsu, and Hirotaka Watada.



Protein kinase cdelta plays a non-redundant role in insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, 282(4):2707–2716, Jan 2007.

- [82] S. Ullrich, M. Prentki, and C. B. Wollheim. Somatostatin inhibition of ca<sup>2+</sup>(+)-induced insulin secretion in permeabilized hit-t15 cells. *Biochem J*, 270(1):273–276, Aug 1990.
- [83] S. Ullrich and C. B. Wollheim. Islet cyclic amp levels are not lowered during alpha 2-adrenergic inhibition of insulin release. *J Biol Chem*, 259(7):4111–4115, Apr 1984.
- [84] S. Ullrich and C. B. Wollheim. Galanin inhibits insulin secretion by direct interference with exocytosis. *FEBS Lett*, 247(2):401–404, Apr 1989.
- [85] Susanne Ullrich, Susanne Berchtold, Felicia Ranta, Guiscard Seeböhm, Guido Henke, Adrian Lupescu, Andreas F Mack, Cho-Ming Chao, Jiping Su, Roland Nitschke, Dorothea Alexander, Björn Friedrich, Peer Wulff, Dietmar Kuhl, and Florian Lang. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (sgk1) mediates glucocorticoid-induced inhibition of insulin secretion. *Diabetes*, 54(4):1090–1099, Apr 2005.
- [86] R. H. Unger and S. Grundy. Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia*, 28(3):119–121, Mar 1985.
- [87] R. H. Unger and L. Orci. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24 Suppl 4:S28–S32, Nov 2000.
- [88] Roger H Unger. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*, 53:319–336, 2002.
- [89] C. Vozzi, S. Ullrich, A. Charollais, J. Philippe, L. Orci, and P. Meda. Adequate connexin-mediated coupling is required for proper insulin production. *J Cell Biol*, 131(6 Pt 1):1561–1572, Dec 1995.
- [90] Nasim Warwar, Suad Efendic, Claes-Göran Ostenson, Esther P Haber, Erol Cerasi, and Rafael Nesher. Dynamics of glucose-induced localization of pkc isoenzymes in pancreatic beta-cells: diabetes-related changes in the gk rat. *Diabetes*, 55(3):590–599, Mar 2006.
- [91] H. J. Welters, S. A. Smith, M. Tadayyon, J. H B Scarpello, and N. G. Morgan. Evidence that protein kinase cdelta is not required for palmitate-induced cytotoxicity in brin-bd11 beta-cells. *J Mol Endocrinol*, 32(1):227–235, Feb 2004.
- [92] Tomoko Yamaguchi, Yoshio Miki, and Kiyotsugu Yoshida. Protein kinase c delta activates ikappab-kinase alpha to induce the p53 tumor suppressor in response to oxidative stress. *Cell Signal*, 19(10):2088–2097, Oct 2007.

- [93] M. Yedovitzky, D. Mochly-Rosen, J. A. Johnson, M. O. Gray, D. Ron, E. Abramovitch, E. Cerasi, and R. Neshher. Translocation inhibitors define specificity of protein kinase c isoenzymes in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, 272(3):1417–1420, Jan 1997.
- [94] Kiyotsugu Yoshida. Pkcdelta signaling: mechanisms of dna damage response and apoptosis. *Cell Signal*, 19(5):892–901, May 2007.
- [95] W. S. Zawalich and K. C. Zawalich. Effects of protein kinase c inhibitors on insulin secretory responses from rodent pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol*, 177(1-2):95–105, May 2001.
- [96] Youssef H Zeidan, Bill X Wu, Russell W Jenkins, Lina M Obeid, and Yusuf A Hannun. A novel role for protein kinase c delta-mediated phosphorylation of acid sphingomyelinase in uv light-induced mitochondrial injury. *FASEB J*, 22(1):183–193, Jan 2008.
- [97] Danhui Zhang, Vellareddy Anantharam, Arthi Kanthasamy, and Anumantha G Kanthasamy. Neuroprotective effect of protein kinase c delta inhibitor rottlerin in cell culture and animal models of parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 322(3):913–922, Sep 2007.
- [98] Danhui Zhang, Arthi Kanthasamy, Yongjie Yang, Vellareddy Anantharam, and Anumantha Kanthasamy. Protein kinase c delta negatively regulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis by enhancing protein phosphatase-2a activity in dopaminergic neurons. *J Neurosci*, 27(20):5349–5362, May 2007.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Susanne Ullrich für ihre sorgfältige Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit und für ihre ausgezeichnete Betreuung.

Ebenfalls möchte ich mich bei Felicia Ranta, Diana Michael, Sieglinde Haug sowie Frau Dr. Anita Hennige und Dorothee Neuscheler für ihre Hilfe und die immer sehr angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich Dr. hum. biol. Heidi Braumüller und Nadine Bauer für ihre Hilfe und das sehr freundliche Arbeitsklima danken.

Mein Dank gilt außerdem meiner Familie und allen die mir nahe stehen.

## Publikationsliste

**Originalarbeiten:** Hennige,A.M., Ranta,F., **Heinzelmann,I.**, Düfer M., Michael,D., Braumüller,H., Lutz,S.Z., Lammers,R., Drews,G., Bosch,F., Häring,H.U., Ullrich,S., (2010) Overexpression of kinase-negative protein kinase Cdelta in pancreatic beta-cells protects mice from diet-induced glucose intolerance and beta-cell dysfunction. *Diabetes* 59(1): 119-27 (IF2007: 8,261)

**Zitierbare Abstracts:** Ranta,F., Hennige,A.M., **Heinzelmann,I.**, Avram,D., Lutz,S.Z., Braumüller,H., Bosch;F., Lammers,R., Ullrich,S., Häring,H.U. (2008) Mice expressing kinase negative PKCdelta in insulin secreting cells are protected from fatty acid - induced beta cell failure. *Diabetologia* 51(Suppl 1): S63

# Lebenslauf

## **Persönliche Daten:**

Name: Isabel Franziska Heinzelmann  
Geburtsort: Rastatt  
Geburtstag: 13.09.1983

## **Schulische Ausbildung:**

1990-1994: Grundschule Rastatt/Plittersdorf  
1994-2003: Ludwig-Wilhelm-Gymnasium in Rastatt; Abschluss: Abitur  
2003-2008: Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Herbst 2005: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2008-2010: Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
Frühjahr 2010: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)

## **Famulaturen**

03/2006: 6 Wochen Innere Medizin, Klinikum Mittelbaden/ Rastatt  
08-09/2006: 4 Wochen Gynäkologie und Geburtshilfe, Diakonissenkrankenhaus Karlsruhe  
03/2007: 4 Wochen Hämatologie, Western General Hospital Edinburgh  
03/2008: 4 Wochen Chirurgische Gemeinschaftspraxis in Rastatt

## **Praktisches Jahr**

08-12/2008: Innere Medizin, Diakonissenkrankenhaus Karlsruhe Rüppurr  
12/08-03/09: Allgemein und Unfallchirurgie, Diakonissenkrankenhaus Karlsruhe Rüppurr  
03-06/2009: Gynäkologie und Geburtshilfe, Diakonissenkrankenhaus Karlsruhe Rüppurr

Rastatt, 12.09.2010

Isabel Heinzelmann