

## 5. Zusammenfassung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, daß Imidazolinverbindungen hinsichtlich der insulinfreisetzenden Wirkung in Beta-Zellen sehr unterschiedlich sind. Die alpha-Rezeptoragonisten mit Imidazolinstruktur hemmten die Insulinfreisetzung durch alpha-2 Rezeptoragonismus, wobei durch Ausschaltung von alpha-2 Rezeptoren eine insulinfreisetzende  $K_{ATP}$ -kanalblockierende Wirkung demaskiert werden konnte. Dagegen bewirkten die meisten getesteten Verbindungen mit Imidazolinstruktur ohne alpha-2 Rezeptoragonismus jedoch eine Glukose-abhängige Steigerung der Insulinfreisetzung. Im Gegensatz zu insulinfreisetzenden Imidazolinen wie Phentolamin blockierten die neuen insulinfreisetzenden Imidazoline alpha-2 Rezeptoren nicht. Erstmals konnten zwei Glukose-abhängig insulinfreisetzende Imidazoline, BL 11282 und BL 11345 durch Bisoxonolmessungen als nicht  $K_{ATP}$ -kanalblockierend identifiziert werden. Damit konnten viele ältere Publikationen bestätigt werden, bei denen zusätzliche Effekte neben einer  $K_{ATP}$ -Kanalblockade durch Imidazoline gezeigt, die Bedeutung der  $K_{ATP}$ -Kanalblockade für das Ausmaß der Insulinfreisetzung jedoch nicht eingeschätzt werden konnte. Die fehlende additive Wirkung bei kombinierter Applikation von depolarisierenden und nicht-depolarisierenden Imidazolinen gab Hinweis darauf, daß die von den meisten Glukose-abhängig insulinfreisetzenden Imidazolinen vermittelte  $K_{ATP}$ -kanalblockierende Wirkung nur einen Zusatzeffekt neben der entscheidenden  $K_{ATP}$ -kanalunabhängigen Wirkung darstellt, und daß die Kanalblockade für das Ausmaß der Insulinfreisetzung und die Glukoseabhängigkeit der Imidazolinwirkung nicht relevant ist. Durch Confokale Laserscanning Mikroskopie (=CLSM) und Nutzung der Fluoreszenz der Naphtholimidazoline konnten erstmals subzelluläre Verteilungen von Imidazolinen mikroskopisch beobachtet werden. Die dabei festgestellte Colokalisation von Imidazolinen mit Zinkionen und Insulin führte zur Annahme eines Imidazolinwirkorts an Insulingranula bzw. mit den Granula- assoziierten Funktionsproteinen. Der genaue Angriffsort ist noch nicht bekannt, mit dem 65 kDa Multi Drug Resistance like (=MDR-like) Glykoprotein, der CaM Kinase II, der Glukokinase, den Synapttagminen und anderen Proteinen sind aber einige insulingranulamembranständige mögliche molekulare Targets bekannt. Die weitere Klärung des Wirkmechanismus und der

Bindungsorte von Imidazolinen stellt eine wichtige und notwendige Aufgabe für eine mögliche Therapieverbesserung des Typ II Diabetes dar.

## 5. Summary

The present work has shown that the effects of imidazoline compounds are very different in regard to their insulin releasing activity in beta cells. Alpha receptor agonists with an imidazoline moiety inhibited insulin release via alpha-2 receptor agonism. Blockade or knockout of alpha-2 receptors led to an insulin release on the other hand and demasked a  $K_{ATP}$  channel blocking activity of the respective compounds. In contrast, most of the tested imidazoline compounds lacking alpha-2 receptor agonism led to a glucose-dependent increase in insulin release. In contrast to insulin releasing imidazolines like phentolamine the new insulin releasing imidazolines did not block alpha-2 receptors. For the first time, imidazoline compounds with glucose-dependent insulin releasing properties, BL 11282 and BL 11345 were identified with the bisoxonol membrane potential measurement as non-depolarizing and non- $K_{ATP}$  channel blocking. Thus, many previous studies that proposed additional imidazoline effects besides their  $K_{ATP}$  channel blocking activity were confirmed. The previous studies did not deal with the question to which extent imidazolines can induce a glucose-dependent increase in insulin release via a  $K_{ATP}$  channel-independent pathway. The present work shows a lacking additive effect with regard to insulin release when depolarizing naphthol imidazolines and non-depolarizing indol-imidazones were applied combined to MIN 6 cells. This led to the assumption that the  $K_{ATP}$  channel blockade mediated by most of the insulin releasing imidazolines is only an additional effect besides a  $K_{ATP}$  channel-independent pathway which is responsible for the extent and glucose-dependency of the mediated insulin release. Confocal laserscanning microscopy (=CLSM) enabled to show the subcellular distribution and binding of fluorescent naphthol imidazolines in MIN 6 cells. Colocalization of the naphthol imidazoline BL 11778 with zinc ions and insulin led to the assumption that the unknown molecular target mediating glucose-dependent increase in insulin release via a  $K_{ATP}$  channel-independent pathway is located on insulin secretory granules or proteins closely associated with them. The target was not

identified but several proteins with important function in regard to insulin release are known to be located on insulin granules such as a 65 kDa mdr-like glycoprotein, CaM kinase II, synaptotagmins, glucokinase and other proteins. Further investigations are required to identify the imidazoline binding site and its molecular structure. This could lead to new antihyperglycemic drugs and an improvement in therapy of type II diabetes.