

# **Regulation der GLP-1 Sekretion intestinaler L-Zellen**

## **Vergleich der enteroendokrinen GLUTag Zelllinie mit einer Primärkultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC)**

Aus dem Institut für  
Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Hamburg  
Abteilung für Toxikologie

Direktor: Professor Dr. med. H. Marquardt  
und der Abteilung Pharmakologie  
der Lilly Forschung GmbH, Hamburg  
Leiter: Professor Dr. med. H.-J. Mest

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Chemie  
der Universität Hamburg

von  
Carsten Brunn  
aus Tübingen

Hamburg, 1999

**1. Gutachter:**

**Prof. Dr. H. Marquardt**

**2. Gutachter:**

**Prof. Dr. H.-J. Mest**

**Mündliche Prüfungen:**

**September 1999**

"Discovery consists of seeing  
what everybody has seen  
and thinking what  
nobody has thought" Szent-Györgyi

## PUBLIKATIONEN

Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

**Brunn, C., Schloos, J., Sewing, S., Lemansky, P., Mest, H.-J.** Characterization of muscarinic receptor subtypes on the GLUTag mouse enteroendocrine cell line. *Diabetologia* 42 (Suppl. 1), A 199, No. 746, 1999.

**Brunn, C., Schloos, C., Sewing, S., Lemansky, P., Mest, H.-J.** Insulin as a feedback regulator of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) release? *Br. J. Pharmacol. (Suppl.)*, 1999, im Druck.

**Brunn, C., Schloos, J., Sewing, S., Lemansky, P., Wawro, S., Mest, H.-J.** Regulation of GLP-1 secretion by muscarinic receptors in the GLUTag enteroendocrine cell line. eingereicht bei *Journal of Cell Science*, 1999.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 DIABETES MELLITUS .....	1
1.2 GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 (GLP-1) .....	1
1.2.1 Entdeckung von GLP-1 .....	1
1.2.2 Posttranslationales Processing von GLP-1 .....	2
1.2.3 Morphologie und Distribution intestinaler L-Zellen .....	3
1.2.4 Physiologische Bedeutung von GLP-1 .....	4
1.3 REGULATION DER GLP-1 SEKRETION .....	4
1.3.1 Modelle zur Untersuchung der GLP-1 Regulation .....	4
1.3.2 Regulation durch Nährstoffe .....	5
1.3.2.1 Kohlenhydrate .....	5
1.3.2.2 Fette .....	6
1.3.2.3 Proteine .....	6
1.3.3 Regulation durch endogene Peptide, Neuropeptide und Neurotransmitter .....	6
1.3.3.1 Endogene Peptide .....	6
1.3.3.2 Neuropeptide .....	8
1.3.3.3 Neurotransmitter .....	9
1.4 AUFGABENSTELLUNG .....	10
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>11</b>
2.1 ZELLKULTUR .....	11
2.1.1 GLUTag-Zelllinie .....	11
2.1.2 Kultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC) .....	11
2.2 IMMUNOFLUORESZENZMIKROSKOPIE .....	14
2.2.1 Prinzip der Immunofluoreszenzmikroskopie .....	14
2.2.2 Immunofluoreszenzmarkierungen an der GLUTag-Zelllinie und an fötalen Rattendarmzellen (FRIC) .....	14
2.2.3 Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper .....	15
2.3 KONFOKALE LASER-SCANNING MIKROSKOPIE (CLSM) .....	18
2.3.1 Prinzip der CLSM .....	18

2.3.2	Vorbereiten der Präparate.....	18
2.3.3	Geräteeinstellungen.....	19
2.4	SEKRETIONSSTUDIEN .....	20
2.4.1	GLP-1 Sekretionsstudien an der GLUTag-Zelllinie.....	20
2.4.2	Reverse Festphasenextraktion mit OASIS-Extraktionsplatten.....	20
2.4.3	GLP-1 (7-36)NH <sub>2</sub> Enzym-Immunoassay (EIA).....	21
2.4.4	MTS-Test .....	22
2.4.5	Statistik.....	23
2.5	IMMUNOPRÄZIPITATION.....	23
2.5.1	Prinzip der Immunopräzipitation .....	23
2.5.2	Immunopräzipitation von Insulinrezeptoren .....	23
2.6	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....	25
2.6.1	Prinzip der PCR.....	25
2.6.2	RNA-Isolation aus GLUTag-Zellen.....	25
2.6.3	Erststrangsynthese .....	26
2.6.4	PCR-Reaktion .....	26
2.6.5	Analyse von PCR-Fragmenten.....	27
2.7	CHEMIKALIEN- UND MEDIENVERZEICHNIS .....	28
2.8	GEFAHRSTOFFE .....	30
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>31</b>
3.1	METHODISCHE EVALUIERUNG.....	31
3.1.1	GLP-1 Aufreinigung und Stabilität .....	31
3.1.1.1	<sup>125</sup> J-GLP-1 (7-36)NH <sub>2</sub> Wiederfindungsrate .....	31
3.1.1.2	Stabilität von GLP-1 (7-36)NH <sub>2</sub> .....	34
3.1.2	Wachstums- und Sekretionseigenschaften der GLUTag-Zelllinie .....	34
3.1.2.1	Wachstumseigenschaften unterschiedlicher GLUTag-Zellchargen .....	35
3.1.2.2	Sekretionseigenschaften unterschiedlicher GLUTag-Zellchargen.....	37
3.1.3	Kultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC) .....	41
3.2	GLP-1 FLUORESZENZMARKIERUNGEN UND KONFOKALE LASER- SCANNING MIKROSKOPIE (CLSM) AN DER GLUTAG-ZELLINIE .....	43
3.2.1	GLP-1 Fluoreszenzmarkierungen.....	43

3.2.2	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) .....	43
3.3	GLP-1 FLUORESZENZMARKIERUNGEN UND KONFOKALE LASER- SCANNING MIKROSKOPIE (CLSM) AN FÖTALEN RATTENDARMZELLEN	45
3.3.1	GLP-1 Fluoreszenzmarkierungen.....	45
3.3.2	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) .....	47
3.4	GLP-1 SEKRETIONSSTUDIEN AN DER GLUTAG-ZELLINIE .....	50
3.4.1	Substanzen mit intrazellulärem Wirkmechanismus .....	50
3.4.1.1	Phorbol 12,13-dibutyrat (PDBU) .....	50
3.4.1.2	Forskolin .....	51
3.4.1.3	3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX).....	52
3.4.1.4	Forskolin/IBMX.....	52
3.4.2	Substanzen mit oberflächenrezeptorvermitteltem Wirkmechanismus .....	53
3.4.2.1	Glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) .....	54
3.4.2.2	Bombesin.....	55
3.4.3	Toxizitätsuntersuchungen der getesteten Substanzen .....	56
3.5	UNTERSUCHUNGEN ZU MUSKARINERGEN REZEPTOREN AN DER GLUTAG-ZELLINIE .....	58
3.5.1	M35 Fluoreszenzmarkierungen.....	58
3.5.2	Pharmakologische Studien mit muskarinergen Modulatoren.....	58
3.5.3	Charakterisierung muskarinergere Rezeptorsubtypen mittels RT-PCR.....	61
3.6	UNTERSUCHUNGEN ZU MUSKARINERGEN REZEPTOREN AN FÖTALEN RATTENDARMZELLEN (FRIC) .....	64
3.7	UNTERSUCHUNGEN ZU INSULINREZEPTOREN AN DER GLUTAG- ZELLINIE .....	66
3.7.1	Immunopräzipitation von Insulinrezeptoren nach Oberflächenbiotinylierung.....	66
3.7.2	IRS-1 Fluoreszenzmarkierungen an der GLUTag-Zelllinie .....	66
3.7.3	Nachweis von Insulinrezeptor mRNA mittels RT-PCR.....	69
3.7.4	Einfluß von Insulin auf die GLP-1 Sekretion.....	69
3.8	UNTERSUCHUNGEN ZU INSULINREZEPTOREN AN FÖTALEN RATTEN- DARMZELLEN (FRIC) .....	71

<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>73</b>
4.1 METHODISCHE EVALUIERUNG.....	73
4.1.1 Modelle zur Untersuchung der GLP-1 Regulation.....	73
4.1.2 Wachstums- und Sekretionseigenschaften der GLUTag-Zelllinie .....	74
4.1.3 Kultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC) .....	76
4.1.4 GLP-1-Assay.....	76
4.2 GLP-1 FLUORESZENZMARKIERUNGEN.....	78
4.3 VERGLEICH DER SEKRETIONSEIGENSCHAFTEN DER GLUTAG ZELLINIE MIT EINER KULTUR FÖTALER RATTENDARMZELLEN (FRIC) .....	79
4.3.1 Proteinkinase A (PKA)-abhängige Signaltransduktionswege.....	79
4.3.2 Proteinkinase C (PKC)-abhängige Signaltransduktionswege .....	81
4.3.3 Glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) .....	82
4.3.4 Bombesin.....	82
4.4 MUSKARINERGE REGULATION DER GLP-1 SEKRETION .....	84
4.4.1 Fluoreszenzmarkierungen muskarinerge Rezeptoren .....	84
4.4.2 Pharmakologische Studien .....	85
4.4.3 Muskarinerge Rezeptorsubtypen.....	87
4.5 INSULINREZEPTOREN AUF INTESTINALEN L-ZELLEN.....	89
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>92</b>
5.1 ZUSAMMENFASSUNG.....	92
5.2 SUMMARY.....	93
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>95</b>
<b>7. DANKSAGUNG</b> .....	<b>108</b>
<b>8. CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>109</b>



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	Adenylatcyklase
ACh	Acetylcholin
BSA	Bovine serum albumine
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
CGRP-I	Calcitonin gene-related peptide
CLSM	Confocal Laser-Scanning Microscopy
4-DAMP	4-Diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methiodide
dbcAMP	Dibutyryl-Cyclo-Adenosinmonophosphat
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyriboculease
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's PBS
DTT	1,4-Dithiotreit
EBSS	Eagle's Balanced Salt Solution
EIA	Enzym-Immunoassay
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRIC	Fetal rat intestinal cell
GIP	Glucose-dependent insulinotropic peptide
GLI	Glucagon-like immunoreactivity
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GLUTag	Glucagon large T antigen
GRP	Gastrin-releasing peptide
GRPP	Glicentin-related pancreatic peptide
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance
IAA	Iodacetamid
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IDDM	Insulin-dependent diabetes mellitus
IFM	Immunofluoreszenzmarkierungen
IgG	Immunglobulin G
IR	Insulinrezeptor
IRS-1	Insulin receptor substrate-1
IVP-1	Intervening peptide-1
MPF	Major proglucagon fragment
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]
NaDOC	Natriumdesoxycholol
NIDDM	Noninsulin-dependent diabetes mellitus

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PDBU	Phorbol-12,13-dibutyrate
PI 3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMS	Phenazinmethosulfat
PMSF	Phenylmethansulfonsäure
PYY	Peptide YY
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse trancription polymerase chain reaction
SA-MP	Streptavidin-Meerettichperoxidase
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SRIF-14	Somatostatin-14
SSTR-5	Somatostatinrezeptor-5
TBS	Tris-Buffered Saline
TEB	Tris-EDTA-Borat
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindihydrochlorid
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
VIP	Vasoactive intestinal peptide

Englische Fachtermini im Text sind kursiv gedruckt.

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 DIABETES MELLITUS

*Der Diabetes mellitus ist eine weit verbreitete Stoffwechselkrankheit von der alleine in Deutschland mehr als 4 Millionen Menschen betroffen sind. Die Behandlung des Diabetes mellitus und seiner Folgekrankheiten kostet jährlich weit über 10 Milliarden DM.*

Der Diabetes mellitus ist auf einen absoluten oder relativen Mangel an Insulin zurückzuführen. Das Fehlen dieses Peptidhormons wirkt sich vor allem auf den Stoffwechsel der Kohlenhydrate und Lipide aus. Der Diabetes tritt in zwei Formen auf. Beim Diabetes vom Typ I (*insulin-dependent diabetes mellitus*, IDDM) werden die insulinproduzierenden B-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas schon in frühem Alter durch eine Autoimmunreaktion zerstört (juvener Diabetes). Der mildere Diabetes vom Typ II (*noninsulin-dependent diabetes mellitus*, NIDDM) setzt meist erst in höherem Alter ein (Altersdiabetes). Er beruht auf verminderter Insulinsekretion oder Störungen der Rezeptorfunktion. Beide Formen des Diabetes mellitus sind zwar behandelbar, aber bis heute nicht heilbar. Ein ungenügend behandelter Diabetes mellitus kann langfristig zu Folgeschäden führen. Dazu gehören diabetische Mikroangiopathien, Nephropathien und Neuropathien.

### 1.2 GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 (GLP-1)

#### 1.2.1 Entdeckung von GLP-1

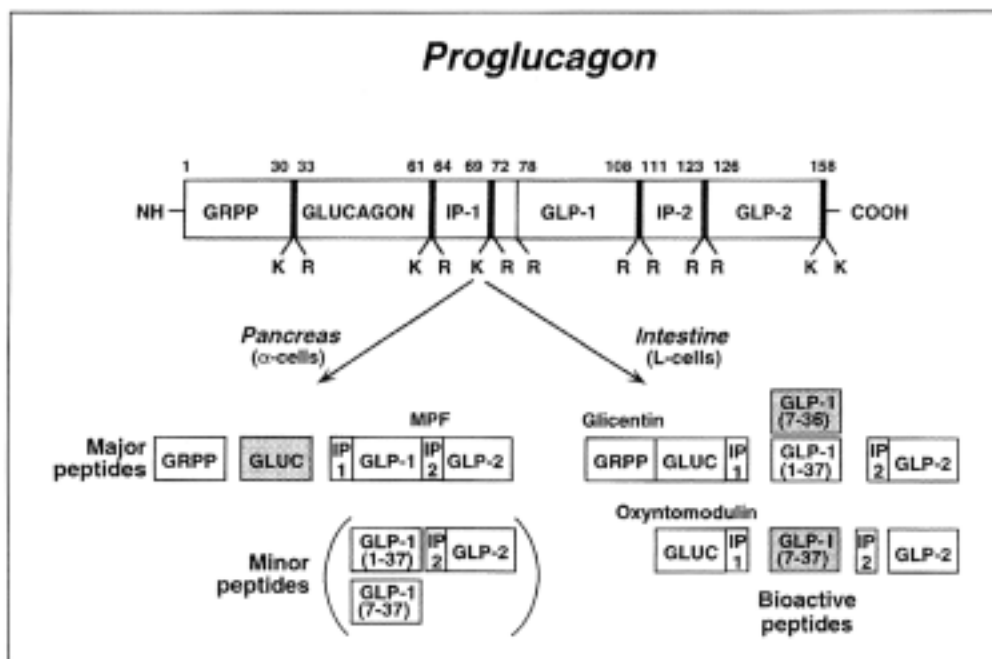
Beobachtungen, daß oral applizierte Glukose im Gegensatz zu intravenös applizierter Glukose zu einer stärkeren Insulinausschüttung führt (Perley und Kipnis, 1967), gaben den Anstoß zur Suche nach Inkretinen aus dem Darm. Die Hypothese der Präsenz einer enteroinsularen Achse ging davon aus, daß Hormone des intestinalen endokrinen Systems nach der Nahrungsaufnahme die Sekretion von Insulin vermitteln. Die Isolierung und Charakterisierung des *glucose-dependent insulinotropic peptide* (GIP) war ein entscheidender Schritt bei der Suche nach intestinalen Inkretinen. GIP wird aus enteroendokrinen Zellen des Duodenums und proximalen Jejunums freigesetzt und führt nach der Nahrungsaufnahme zur glukose-abhängigen Steigerung der Insulinsekretion (Creutzfeldt und Ebert, 1985). Da nach der Immunoneutralisierung des enteroendokrinen Peptids aus Darmextrakten weiterhin eine glukoseabhängige Insulinausschüttung zu beobachten war, wurde die Präsenz weiterer Inkretine angenommen (Creutzfeldt und Ebert, 1985). Vor mehr als einem Jahrzehnt gelang schließlich der Nachweis von *glucagon-like peptide-1* (GLP-1), einem weiteren entero-

endokrinen Peptid, das die glukoseabhängige Insulinausschüttung vermittelt (Bell et al., 1983; Mojsov et al., 1987; Holst et al., 1987 b; Kreymann et al., 1987; Drucker et al., 1987). Kolligs et al. (1995) und Wang et al. (1995) demonstrierten, daß GLP-1 bis zu 60 % der glukose-induzierten Insulinfreisetzung vermittelt.

### 1.2.2 Posttranslationales Processing von GLP-1

Bereits im Jahre 1923 wurde in den A-Zellen des Pankreas das Peptidhormon Glukagon nachgewiesen. Glukagon ist an der Regulation der Glukoneogenese, Glukogenolyse und Lipolyse beteiligt. 25 Jahre später postulierten Sutherland und de Duve das Vorhandensein von glukagonartigen Substanzen außerhalb des Pankreas. Die Klonierung und Sequenzierung des Präproglukagon-Gens und Glukagon-Präkursors in verschiedenen Spezies ermöglichte schließlich die Aufklärung der Biosynthese von Glukagon und glukagonähnlichen Peptiden (Bell et al., 1983; Heinrich et al., 1984).

Der humane Glukagon-Präkursor Proglukagon, besteht aus einem Signalpeptid, *glucagon-related pancreatic peptide* (GRPP), Glukagon, einem *intervening peptide* (IPV1) und zwei *glucagon-like peptides* (GLP-1 und GLP-2), die durch ein weiteres *intervening peptide* (IPV2) getrennt sind (siehe Abb. 1-1). Untersuchungen zeigten, daß Proglukagon im Gehirn, Pankreas und Darm unterschiedlich prozessiert wird (Mojsov et al., 1986; Orskov et al.,

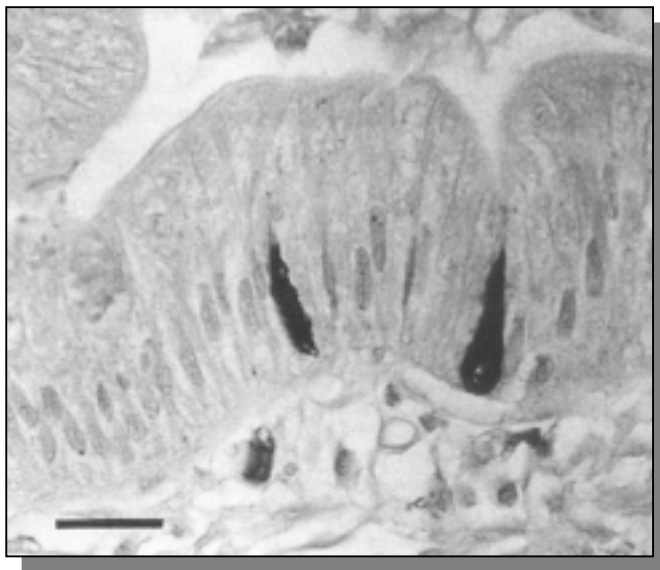


**Abb. 1-1:** Posttranslationales Processing von Proglukagon im Pankreas und Darm (aus: Fehmann HC., Göke B. (eds): The Insulinotropic Gut Hormone Glucagon-like Peptide-1. Front. Diabetes. Basel. Karger, Vol 13, pp 15-23, 1997).

1987). In den A-Zellen des Pankreas wird Proglukagon hauptsächlich zu Glukagon, GRPP und *major proglucagon fragment* (MPF) prozessiert. Im Darm dagegen wird GLP-1 (GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> und GLP-1 (7-37)), GLP-2, Glicentin, Oxyntomodulin und IVP-2 gebildet. Vermutlich sind Prohormon-Konvertasen für die gewebespezifische Prozessierung Proglukagons im Darm verantwortlich (Rothenberg et al., 1995; Dhanvantari et al., 1996). Obwohl das enteroendokrine Peptid GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> quantitativ den Hauptteil an sezerniertem GLP-1 im Menschen darstellt, wurde in-vivo gezeigt, daß GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> und GLP-1 (7-37) äquipotent in Bezug auf ihre insulinsekretionssteigernden Effekte sind (Mojsov et al., 1986; Mojsov et al., 1990).

### **1.2.3 Morphologie und Distribution intestinaler L-Zellen**

Die Prozessierung von Proglukagon zu GLP-1 im Darm erfolgt in L-Zellen, die aus pluripotenten Stammzellen der Krypten stammen und die neben den enterchromaffinen Zellen die zweitgrößte Population an endokrinen Zellen darstellen (Potten und Loeffler, 1990). Bei L-Zellen handelt es sich um Epithelzellen, die sich hauptsächlich in den Lieberkühnschen



**Abb. 1-2:** L-Zellen im Epithelium der humanen jejunalen Mukosa. Die Zellen liegen dreieckig oder kolbenförmig vor. Balken = 15 µm. (aus: Fehmann HC., Göke B. (eds): *The Insulinotropic Gut Hormone Glucagon-like Peptide-1*. Front. Diabetes. Basel. Karger, Vol 13, pp 49-64, 1997).

Krypten und vereinzelt in den intestinalen Villi befinden (Capella et al., 1976; Grimelius et al., 1976). Sie liegen dreieckig oder kolbenförmig vor (Abb. 1-2), und unterscheiden sich morphologisch stark von den A-Zellen des Pankreas und Darms (Capella et al., 1976). GLP-1 ist in Sekretgranula homogener Größe lokalisiert, die sich hauptsächlich auf der basolateralen Seite der Zelle befinden (Eissele et al., 1992). Bei GLP-1 Fluoreszenzmarkierungen des Gastrointestinaltrakts der Ratte, des Schweins und des Menschen wurden im Ösophagus, Korpus und Antrum

keine GLP-1 immunopositiven Zellen detektiert (Eissele et al., 1992). Bei Ratten wurden nur im Duodenum vereinzelt immunopositive Zellen beobachtet. Bei allen drei Spezies wurden im Jejunum und Ileum sehr viele L-Zellen gezählt, wobei im Ileum der Ratte die meisten immunopositiven Zellen vorlagen. Im Kolon und Rektum von Schwein und Mensch war ein

Anstieg der L-Zelldichte von proximal nach distal zu verzeichnen. Beim Menschen lagen im Rektum sogar mehr GLP-1 immunopositive Zellen vor als im Ileum. Nur bei der Ratte nahm die L-Zelldichte im Rektum stark ab. Vereinfacht kann man also sagen, daß die L-Zelldichte sowohl im Ileum als auch im Kolon von proximal nach distal zunimmt.

### **1.2.4 Physiologische Bedeutung von GLP-1**

Wie bereits einleitend erwähnt wurde, induziert das enteroendokrine Peptid GLP-1 die glukoseabhängige Freisetzung von Insulin über GLP-1 Rezeptoren auf B-Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas. GLP-1 Rezeptoren, die zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören, wurden erstmals auf der permanenten Insulinoma-Zelllinie RINm5F nachgewiesen (Göke und Conlon, 1988).

Neben den insulinsekretionssteigernden Effekten an B-Zellen inhibiert GLP-1 die Magenentleerung und die Freisetzung von Glukagon aus dem Pankreas (Kreyman et al., 1987; Gutniak et al., 1992; Nauck et al., 1993 a; Ritzel et al., 1995; Nauck et al., 1996; Todd et al., 1997; Ahren et al., 1997). GLP-1 steigert außerdem die Expression des Proinsulins in-vivo (Fehmann und Habener, 1992).

Erste Studien zum therapeutischen Einsatz von GLP-1 liegen bereits vor. Die intravenöse Gabe von GLP-1 normalisierte sowohl Nüchtern- als auch postprandiale Glukosespiegel bei Typ II Diabetikern (Nauck et al., 1993 b; Rachman et al., 1996; Todd et al., 1997). Außerdem erhöhte GLP-1 die Glukose-Clearance bei gesunden Probanden, was auf eine bedeutende Rolle des Peptids im Glukosestoffwechsel hinweist (Hvidberg et al., 1994). GLP-1 ist im Pankreas jedoch auch in glukoseunabhängige Regulationsprozesse involviert. Das endokrine Peptid steigerte dort die Somatostatin-Sekretion aus menschlichen Inseln (Fehmann et al., 1995).

Außerdem liegen Befunde vor, die auf eine Rolle des enteroendokrinen Peptids in der Glykogensynthese in Muskeln und Fettgewebe hinweisen (Valverde et al., 1994). Im Gehirn von Ratten beeinflußt GLP-1 das Freßverhalten (Turton et al., 1996). Die Mechanismen dieser Effekte sind bisher noch unbekannt.

## **1.3 Regulation der GLP-1 Sekretion**

### **1.3.1 Modelle zur Untersuchung der GLP-1 Regulation**

Zur Untersuchung der Regulation der GLP-1 Sekretion sind zahlreiche in-vitro und in-vivo Modelle beschrieben. Die permanenten Zelllinien STC-1 und GLUTag, die beide von intestinalen Tumoren abgeleitet wurden, stellen zwei L-Zellmodelle mit homogener

Zellpopulation dar (Drucker et al., 1992; Abello et al., 1994). Die Kultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC) und die Kultur angereicherter L-Zellen des Hundedarms sind Primärkulturen mit heterogener Zellpopulation (Brubaker und Vranic, 1987; Buchan et al., 1987). Diese Systeme bieten gegenüber permanenten Zelllinien den Vorteil, daß sie nicht von Tumorgewebe abgeleitet wurden und dadurch eher physiologische Bedingungen darstellen. Allerdings haben sie aufgrund der heterogenen Zellpopulation den Nachteil, daß die Regulation des enteroendokrinen Peptids nicht isoliert an L-Zellen untersucht werden kann.

Außerdem sind zahlreiche isoliert perfundierte Organmodelle beschrieben, die Untersuchungen zur GLP-1 Regulation am Ileum oder Kolon ermöglichen (Plaisancie et al., 1994; Herrmann-Rinke et al., 1995; Orskov et al., 1986). Vereinzelt wurden auch in-vivo Studien an Ratte, Hund und Mensch durchgeführt, die es jedoch meist nicht erlaubten, die beobachteten Effekte zur Regulation der GLP-1 Sekretion direkt den intestinalen L-Zellen zuzuordnen (Sagor et al., 1985; Roberge et al., 1986; Matsuyama et al., 1980; Bruzzone et al., 1983; Nauck et al., 1993 b).

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte GLUTag-Zelllinie und Primärkultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC) erwiesen sich in der Vergangenheit bereits als wertvolle Modelle zur Untersuchung der GLP-1 Regulation. Die GLUTag-Zelllinie, die aus intestinalen endokrinen Tumoren des Dickdarms von *proglucagon-simian virus 40 large T antigen* transgenen Mäusen stammt, weist als einzige Zelllinie ein Hormonmuster auf, das dem der nativen L-Zelle sehr ähnlich ist (Drucker et al., 1992). Die Kultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC) stellt im Gegensatz zur Kultur angereicherter L-Zellen des Hundedarms ein technisch weniger aufwendiges und kostengünstigeres Modell dar. Die Vielzahl der Veröffentlichungen, die wichtige Beiträge zum Verständnis der GLP-1 Regulation lieferten, bestätigen dies (Brubaker und Vranic, 1987; Rocca und Brubaker, 1995; Brubaker, 1991).

### **1.3.2 Regulation durch Nährstoffe**

#### ***1.3.2.1 Kohlenhydrate***

Die Annahme, das Glukose eine wichtige Rolle bei der Regulation der GLP-1 Sekretion in L-Zellen spielt ist naheliegend. Mehrere Studien an der Ratte und am Menschen zeigten übereinstimmend die dosisabhängige Stimulation der GLP-1 Sekretion durch Glukose (Holst et al., 1990; Roberge und Brubaker, 1993). Außerdem wurde der Glukosesensor Glukokinase auf L-Zellen detektiert (Jetton et al., 1994). Am isoliert perfundierten Ileum wurde zur glukosevermittelten GLP-1 Freisetzung Natrium benötigt, was auf eine mögliche Rolle des brush-border Natrium/Glukose-Kotransporters hinweist (Herrmann et al., 1995). Die meisten

Studien stimmen darüber überein, daß Konzentrationen in der Größenordnung von 5-25 % Glukose benötigt werden.

Trotz dieser auf den ersten Blick eindeutigen Befunde erscheint es fragwürdig, ob Glukose auch in physiologischen Konzentrationen einen direkten Einfluß auf die GLP-1 Sekretion an L-Zellen hat. Physiologische Glukose-Konzentrationen im Ileum liegen bei maximal 0,02 % bzw. 1 mM, also deutlich unterhalb der zuvor berichteten Konzentrationen. Es ist davon auszugehen, daß Glukose in-vivo keinen entscheidenden primären Faktor in der GLP-1 Freisetzung der L-Zelle darstellt.

### ***1.3.2.2 Fette***

Langkettige Fettsäuren stimulieren im Gegensatz zu kurz- und mittelkettigen Fettsäuren die GLP-1 Sekretion in-vitro und in-vivo (Brubaker, 1991; Rocca und Brubaker, 1995). Neben den Kettenlängen scheint auch der Sättigungsgrad der Fettsäuren einen entscheidenden Einfluß auf das Sekretionsverhalten zu haben. Einfach ungesättigte Fettsäuren steigern die Peptidfreisetzung stärker als mehrfach ungesättigte oder gesättigte Fettsäuren (Ohneda et al., 1987; Rocca und Brubaker, 1995). Die involvierten Regulationsmechanismen sind bis heute nicht eindeutig geklärt, jedoch wird die Rolle eines *intestinal fatty acid binding proteins* und einer  $\zeta$ -Isoform der Proteinkinase C (PKC) diskutiert (Rocca und Brubaker, 1995). Gallensäuren stimulieren ebenfalls die Freisetzung von GLP-1 aus L-Zellen (Adrian et al., 1993). Somit ergibt sich, daß die gesteigerte GLP-1 Sekretion nach der Aufnahme fettreicher Kost direkt über Fettsäuren und indirekt über freigesetzte Gallensäuren vermittelt wird.

### ***1.3.2.3 Proteine***

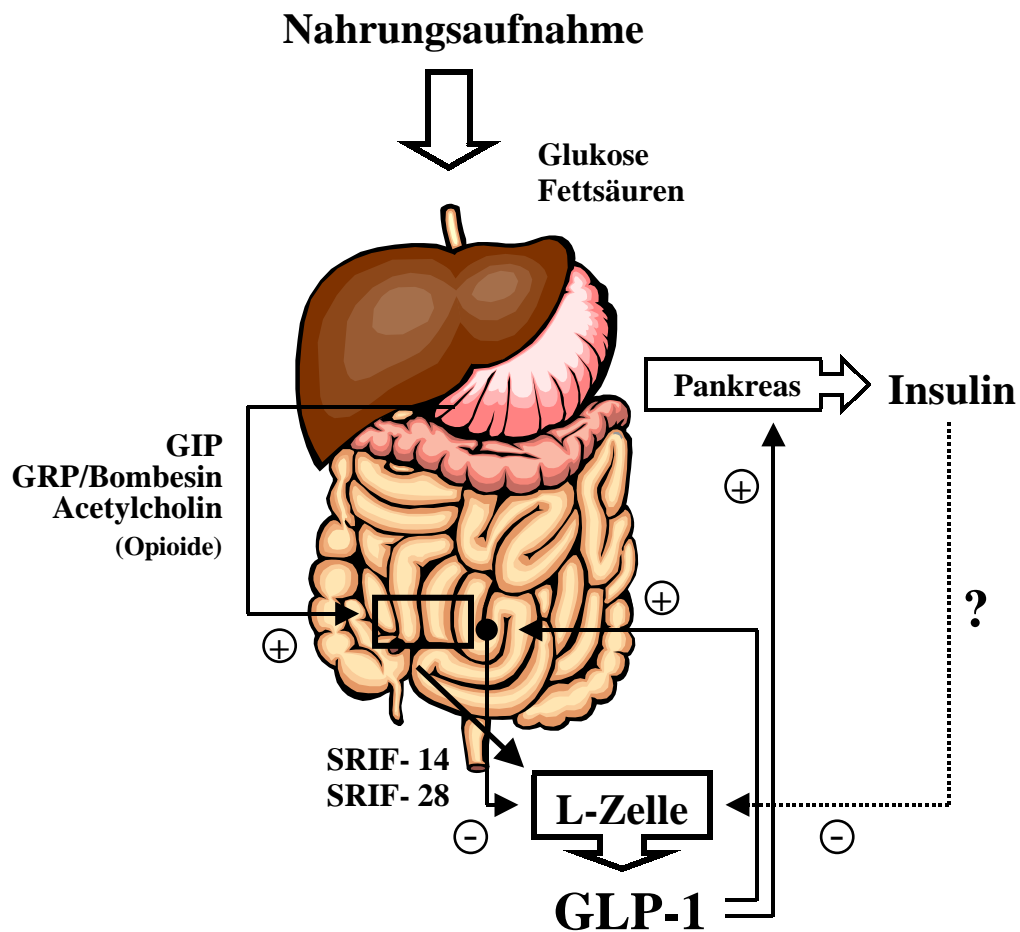
Im Gegensatz zu Kohlenhydraten und Fetten haben Proteine bei der Regulation der GLP-1 Sekretion keine entscheidende Bedeutung (Herrmann et al., 1995; Elliott et al., 1993).

## **1.3.3 Regulation durch endokrine Peptide, Neuropeptide und Neurotransmitter**

### ***1.3.3.1 Endogene Peptide***

Bedenkt man die distale Lage der L-Zellen im Darmtrakt und die Zeitspanne von nur 5-10 min zwischen Nahrungsaufnahme und gesteigerter GLP-1 Sekretion, liegt der Einfluß weiterer Faktoren bei der Sekretionsvermittlung nahe. Untersuchungen an einem Rattenmodell demonstrierten, daß kein direkter Kontakt von Nährstoffen mit L-Zellen nach der Nahrungsaufnahme notwendig ist, um die GLP-1 Sekretion zu steigern (Roberge und Brubaker, 1991). Vielmehr werden zahlreiche endokrine Peptide, Neuropeptide und





**Abb. 1-3:** Schematische Darstellung der Regulation der GLP-1 Sekretion an intestinalen L-Zellen.

Neurotransmitter als entscheidende Mediatoren im Rahmen einer proximal-distalen Schleife diskutiert (Roberge und Brubaker, 1991).

Daher wurde eine Vielzahl von endogenen Peptiden an unterschiedlichen Modellen und Spezies auf ihre GLP-1 sekretionssteigernden Eigenschaften untersucht. Von den getesteten Peptiden GIP, Cholecystokinin (CCK), Gastrin, Motilin, Sekretin, GLP-1, GLP-2, Glukagon, Neurotensin und PYY hatte nur das duodenale Peptid GIP einen sekretionssteigernden Einfluß auf die GLP-1 Regulation. Diese Effekte wurden an der Ratte in-vitro und in-vivo und an der GLUTag-Zelllinie beobachtet (Brubaker, 1991; Roberge und Brubaker, 1993; Plaisancie et al., 1994). Am Menschen wurden jedoch keine Effekte des duodenalen Peptids verzeichnet (Kreymann et al., 1987; Nauck et al., 1993 b). Es wird angenommen, daß die GIP-induzierte GLP-1 Sekretion über einen Proteinkinase A (PKA)-abhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt wird (Usdin et al., 1993). Philippe et al. (1988) demonstrierten,

daß die Aktivierung der PKA wahrscheinlich über ein *cAMP-response element* des Proglukagon-Gens reguliert wird. Dies erklärt die gesteigerte GLP-1 Biosynthese in FRIC-Kulturen, die neben der gesteigerten GLP-1 Sekretion nach GIP-Inkubation beobachtet wurde (Huang und Brubaker, 1995). Man darf also annehmen, daß GIP zumindest bei der Ratte einen wichtigen Mediator der enteroendokrinen Schleife darstellt.

Im Gegensatz zu endokrinen Stimulatoren der GLP-1 Sekretion wurden endokrine Inhibitoren bisher nur unzureichend untersucht. Somatostatin-28 (SRIF-28), ein Peptid des Ileums, wurde als potenter Inhibitor an L-Zellen identifiziert, der seine Effekte über einen Pertussistoxin-sensitiven Mechanismus vermittelt (Brubaker, 1991). Brubaker zeigte, daß GLP-1 die Somatostatin-Sekretion in-vitro steigert und somit einen enteroendokrinen Rückkopplungs-inhibitor an intestinalen L-Zellen darstellen könnte (unveröffentlichte Daten).

Das Peptidhormon Insulin ist ein weiterer, kaum untersuchter potentieller Inhibitor der GLP-1 Sekretion an L-Zellen. Sowohl bei Typ I und II Diabetikern als auch bei Insulindefizienten Ratten, wurden erhöhte GLP-1 Spiegel beobachtet (Gutniak et al., 1992; Nauck et al., 1993 b; Brubaker et al., 1989; Matsuyama et al., 1975; Kreyman et al., 1988). Außerdem hemmte Insulin die GLI Freisetzung am Menschen (Matsuyama et al., 1975). Allerdings wurden L-Zellen bisher nicht direkt auf die Präsenz von Insulinrezeptoren untersucht. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bearbeitung dieser Fragestellung.

### ***1.3.3.2 Neuropeptide***

Neben endokrinen Peptiden wurden zahlreiche Neuropeptide auf ihre GLP-1 sekretionssteigernden Eigenschaften untersucht. *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP-I), Galanin, *gastrin-releasing peptide* (GRP), Opioide, Somatostatin-14 (SRIF-14) und VIP wurden an unterschiedlichen Spezies und Modellen getestet. GRP, das eine wichtige Komponente des nichtadrenergen und nichtcholinergen Teil des Nervus Vagus darstellt, erwies sich als potenter Stimulator der GLP-1 Freisetzung an Ratte, Hund, Schwein und Mensch (Roberge et al., 1996; Brubaker, 1991; McDonald et al., 1983; Orskov et al., 1986; Bruzzone et al., 1983). Die GRP-induzierte Peptidfreisetzung wird durch einen Protein-kinase C (PKC)-abhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt (Fanger et al., 1991). Das intestinale Neuropeptid GRP hatte keinen Einfluß auf die GLP-1 Biosynthese in-vitro (Brubaker, unveröffentlichte Daten). GRP stellt also im Gegensatz zu GIP einen wichtigen Faktor in der Regulation von GLP-1 am Menschen dar.

Außerdem beeinflussten CGRP-I, zahlreiche Opioide und SRIF-14 die GLP-1 Sekretion. CGRP-I steigerte die Freisetzung des Peptids an Ratten (Brubaker, 1991), während am Menschen eine Verminderung der Sekretion zu beobachten war (Kraenzlin et al., 1985). Da

CGRP-I ein potenter Stimulator der Somatostatin-Sekretion ist, kann der inhibitorische Effekt des Neuropeptids am Menschen eventuell durch diesen indirekten Mechanismus erklärt werden (Brubaker und Greenberg, 1993).

Die Opioiden MET-Enkephalin und  $\beta$ -Endorphin steigerten die GLP-1 Freisetzung an der Ratte und am Hund in-vitro (Brubaker, 1988; Manaka et al., 1994). SRIF-14 inhibierte analog zu SRIF-28 die Peptidsekretion an der Ratte und am Hund in-vitro und in-vivo (Bloom und Pollak, 1982; Sakurai et al., 1975; Brubaker, 1991; Barber et al., 1987). Untersuchungen zeigten allerdings, daß SRIF-28 in-vitro 100-fach potenter ist als SRIF-14, was auf die Präsenz von SSTR-5 Rezeptoren auf L-Zellen hinweist (Brubaker, 1991; Viollet et al., 1995).

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, daß diesen Neuropeptiden im Gegensatz zu GRP unter physiologischen Bedingungen nur eine feinregulatorische Rolle bei der GLP-1 Sekretion zukommt.

### *1.3.3.3 Neurotransmitter*

Der Einfluß der Neurotransmitter Acetylcholin und Adrenalin auf die GLP-1 Sekretion wurde bisher nur unzureichend untersucht, und die vorliegenden Daten sind oft widersprüchlich. Während cholinerge Agonisten die Sekretion des enteroendokrinen Peptids an der Ratte in-vitro steigerten (Brubaker, 1991; Plaisancie et al., 1994), wurden an Hunden widersprüchliche Effekte beobachtet. Ohneda et al. (1989) berichteten sekretionssteigernde und durch Atropin hemmbare Effekte Acetylcholins in-vivo; dagegen konnten Yoshida et al. (1980) keine Effekte an Hunden feststellen. An einer Primärkultur angereicherter L-Zellen des Hundedarms inhibierte Carbachol die Adrenalin-induzierte GLP-1 Freisetzung (Buchan et al., 1987). An der STC-1 Zelllinie, einer enteroendokrinen Tumorzelllinie der Maus, sind  $M_3$ -Rezeptoren in die Regulation des enteroendokrinen Peptids involviert (Abello et al., 1994). Am Menschen belegte eine Studie mit gesunden Probanden, daß Atropin die GLP-1 Sekretion inhibiert (Balks et al., 1997). Aufgrund dieser Befunde wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zur muskarinergen Regulation der GLP-1 Sekretion an der GLUTag Zelllinie und an einer Primärkultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC) durchgeführt.

Die Rolle Adrenalins erscheint ebenfalls unklar. Während der Neurotransmitter am isoliert perfundierten Kolon der Ratte über  $\beta$ -Rezeptoren die Freisetzung von GLP-1 vermittelte, wurden an FRIC-Kulturen keine Effekte verzeichnet (Plaisancie et al., 1994; Brubaker, 1991). Am Hund hatte Epinephrin in-vivo keine oder nur geringfügige Effekte (Ohneda et al., 1989; Lickley et al., 1981); dagegen steigerte der Neurotransmitter die GLP-1 Sekretion in-vitro (Buchan et al., 1987). Offensichtlich bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Rolle Adrenalins bei der Regulation der GLP-1 Sekretion eindeutig zu klären.

## **1.4 AUFGABENSTELLUNG**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die permanente enteroendokrine GLUTag Zelllinie und eine Primärkultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC) etabliert und charakterisiert.

Mit Hilfe von Immunofluoreszenzmarkierungen und der Konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) wurde die Präsenz und räumliche Verteilung von GLP-1 in GLUTag-Zellen und fötalen Rattendarmzellen (FRIC) untersucht. Die Tauglichkeit der GLUTag-Zelllinie als L-Zellmodell wurde durch GLP-1 Sekretionsstudien evaluiert. Zur Aufreinigung und Quantifizierung von GLP-1 mußte ein Assay modifiziert werden.

Da in der Literatur widersprüchliche Aussagen zur Regulation der GLP-1 Sekretion durch Neurotransmitter vorlagen, wurde aufbauend auf die bisherigen Untersuchungen die Rolle von muskarinergen Rezeptoren in der GLP-1 Sekretion an der GLUTag-Zelllinie und an fötalen Rattendarmzellen untersucht. Liegen auf intestinalen L-Zellen muskarinerge Rezeptoren vor? Sind muskarinerge Rezeptoren funktionell mit der GLP-1 Sekretion verknüpft? Welche muskarinergen Rezeptorsubtypen liegen in GLUTag-Zellen vor?

Außerdem wurden L-Zellen auf die Präsenz von Insulinrezeptoren untersucht, da Hinweise vorlagen, daß Insulin einen potentiellen Rückkopplungsinhibitor der GLP-1 Sekretion darstellt. Diese Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Arbeit immunozytochemisch, proteinchemisch, pharmakologisch und molekularbiologisch bearbeitet.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 ZELLKULTUR

#### 2.1.1 GLUTag-Zelllinie

Die Kultivierung der GLUTag-Zelllinie erfolgte in DMEM unter 10 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C. Dem Kulturmedium wurden 10 % FCS und 2,5 ml eines Gemischs aus Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) hinzugefügt.

Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen gehalten und bei Subkonfluenz mit Trypsin-EDTA abgelöst und umgesetzt. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

Die Untersuchungen zu den Wachstumseigenschaften der GLUTag Chargen D94, D97 und R98 wurden mit hitzeinaktivierten und nicht-hitzeinaktivierten Seren durchgeführt.

#### 2.1.2 Kultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC)

Das vorliegende Protokoll zur Präparation fötaler Rattendarmzellen stellt eine Modifikation der Originalvorschrift dar (Brubaker und Vranic, 1987). Durch die Veränderungen wurden sowohl die Zellausbeute als auch die Zellanheftung optimiert.

Am Vortag der Präparation wurden chirurgisches Besteck, Glastrichter, Gaze, Metallwanne, und Petrischalen autoklaviert. Eine tragende Ratte (mindestens 19. Tag) wurde durch Genickschlag betäubt und durch Entbluten getötet. Die Bauchdecke wurde mit 70 % Ethanol besprüht, der Bauchraum mit einer Schere geöffnet und die Föten freigelegt. Nach dem Öffnen des amniotischen Sacks wurden Nabelschnur und Kopf der Föten abgetrennt. Die Föten wurden in eine Petrischale mit 70 % Ethanol überführt.

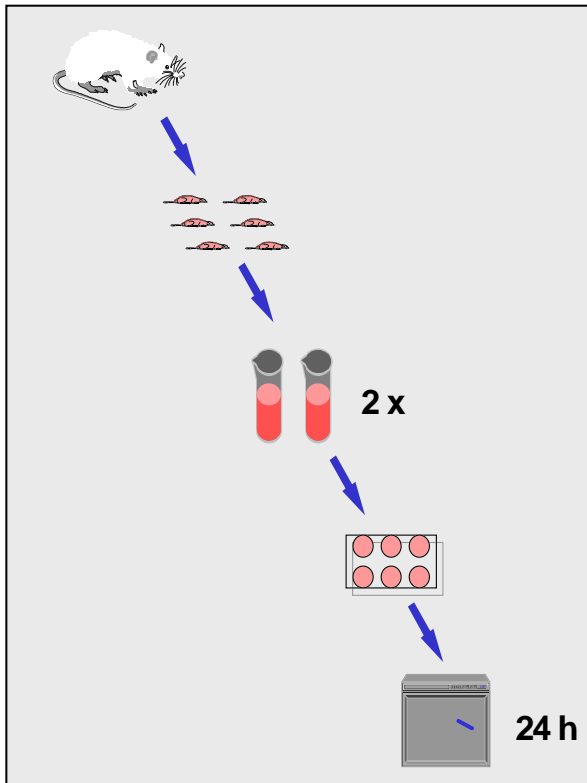
Alle folgenden Arbeitsschritte wurden in einer Sterilbank durchgeführt. Die Föten wurden mit 70 % Ethanol in der Bauchregion äusserlich von Blut gereinigt und im rechten Winkel zum Präparator auf eine sterile Plexiglasplatte gelegt. Die Bauchregion wurde mit einer großen Pinzette seitlich einklemmt und unter leichtem Druck mit einer kleinen Schere geöffnet. Der Darm wurde mit einer kleinen Pinzette gefaßt und vorsichtig herausgezogen. Dabei ist auf Pankreasgewebe zu achten und dieses gegebenenfalls zu entfernen. Pankreasgewebe ist weiß und kann dadurch sicher vom Darmgewebe unterschieden werden. Die Därme wurden in eine Petrischale mit Kultur-HANKS überführt und mehrmals mit Kultur-HANKS gewaschen, um Zellfragmente und Erythrozyten zu entfernen.

Die Därme wurden anschließend erneut auf das Vorhandensein von Pankreasgewebe untersucht. Nach dem Zerkleinern der Därme mit einer kleinen Schere in einer Petrischale mit

## Material und Methoden

5 ml Kultur-HANKS wurden die Darmfragmente in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Kultur-HANKS überführt. Das Waschen der Darmfragmente erfolgte für 5 min in einem auf 37 °C temperierten Schüttelbad bei mittlerer Schüttelgeschwindigkeit. Nach dem Absinken der Fragmente wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen.

Für die erste Verdauung wurde die vorgewärmte Enzymlösung I zu den Darmfragmenten gegeben und für 15 min in einem Schüttelbad bei mittlerer Schüttelgeschwindigkeit inkubiert. Nach dem Absinken der Darmfragmente wurde der Überstand abgenommen und über einen



**Abb. 2-1:** Schematische Darstellung der Präparation fötaler Rattendarmzellen.

Trichter mit steriler Gaze in ein weiteres 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Für die zweite Verdauung wurde die temperierte Enzymlösung II zu den Darmfragmenten gegeben und für 10 min im Schüttelbad inkubiert. Das Zentrifugenröhrchen mit dem filtrierte Überstand wurde für 10 min bei 65 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde danach bis auf 2 ml abgenommen und für eine eventuelle dritte Verdauung im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Das Darmsediment wurde anschließend in den verbleibenden 2 ml resuspendiert. Das Zentrifugenröhrchen der zweiten Verdauung wurde dem Schüttelbad entnommen, und nach dem Absinken der Darmfragmente wurde der Überstand über

einen Trichter mit Gazefilter in das Zentrifugenröhrchen mit dem resuspendierten Darmsediment überführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 65 x g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und zu der vorgewärmten Enzymlösung der ersten Verdauung gegeben. War das Darmsediment aus zwei Verdauungen nicht ergiebig genug, wurde eine dritte Verdauung für 10 min mit den gesammelten Enzymüberständen der letzten Verdauungen durchgeführt. Lag bereits nach der zweiten Verdauung ein ausreichend großes Zellsediment vor, erwies es sich als praktikabel, dieses zum Waschen auf zwei Zentrifugenröhrchen zu verteilen. Dadurch wurde die Ausbeute vitaler Zellen erhöht.

## Material und Methoden

---

Anschließend wurde 2-3 x mit jeweils 8 ml Kultur-Medium gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde für 10 min bei 65 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 2 ml abgenommen und mit dem entsprechenden Volumen an Kultur-Medium aufgefüllt, resuspendiert und gepoolt (siehe unten). Danach wurden die Zellen in 60 mm Petrischalen ausgesät, dazu wurden 2 ml Zellsuspension pro Petrischale eingesetzt. Die Inkubation erfolgte unter 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C.

**Enzymlösung I und II :** 40 mg Sigma Blend Kollagenase  
45 mg Hyaluronidase  
5 mg Deoxyribonuclease I

Die Enzyme wurden in zwei 15 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen, in 10 ml Kultur-HANKS gelöst, sterilfiltriert und im Wasserbad auf 37 °C temperiert.

**Kultur-HANKS :** Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) +  
5 % Fötale Rinderserum +  
2 ml Pen/Strep (10000 IU/10000 µg)

**Kultur-Medium :** Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) +  
5 % Fötale Rinderserum +  
2 ml Pen/Strep (10000 IU/10000 µg)

**Zellaussaat :**

Anzahl der Föten	Kultur-Medium	Anzahl der Föten	Kultur-Medium
7	24 ml	14	44 ml
8	24 ml	15	48 ml
9	28 ml	16	52 ml
10	32 ml	17	56 ml
11	36 ml	18	56 ml
12	40 ml	19	60 ml
13	40 ml	20	64 ml

## 2.2 IMMUNOFLUORESZENZMIKROSKOPIE

### 2.2.1 Prinzip der Immunfluoreszenzmikroskopie

Immunfluoreszenzmarkierungen ermöglichen den Nachweis von Antigenen mittels spezifischer Fluorophor-gekoppelter Antikörper. Je nach Art der Vorbehandlung der Präparate können intrazelluläre oder oberflächengebundene Antigene von Zellen detektiert werden. Der Nachweis erfolgt mittels eines Fluoreszenzmikroskops, indem der Fluoreszenzfarbstoff angeregt wird und das emittierte Licht durch Filter der entsprechenden Wellenlänge ins Okular tritt. Bei den hier eingesetzten indirekten Immunfluoreszenzmarkierungen ist der erste verwendete Antikörper nicht mit einem Fluorophor gekoppelt, sondern erst ein zweiter Antikörper, der gegen den ersten gerichtet ist. Der Einsatz von zwei Antikörpern führt zu einer wesentlichen Fluoreszenzverstärkung.

### 2.2.2 Immunfluoreszenzmarkierungen an der GLUTag-Zelllinie und an fötalen Rattendarmzellen

Fötale Rattendarmzellen (nach Vorschrift präpariert) oder GLUTag-Zellen wurden in 6er Multiwellplatten auf sterilen 20 x 20 mm Deckgläschen ausgesät, und im Brutschrank bei 37 °C unter 5 oder 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. GLUTag-Zellen sollten als Monolayer vorliegen, um eine gleichmäßige Benetzung der Zellen mit den Antikörpern zu gewährleisten. Die fötalen

- **Aussäen**
- **Waschen** mit EBSS
- **Fixierung** mit 4 % PFA
- **Waschen** mit PBS
- **Blocken**
- **1. Antikörper** über Nacht
- **Waschen** mit PBS
- **2. Antikörper**
- **Waschen** mit PBS
- **Eindeckeln** in MOWIOL/DABCO
- **Fluoreszenzmikroskopische Auswertung**

**Abb. 2-2:** Kurzprotokoll zur Durchführung von Immunfluoreszenzmarkierungen an GLUTag Zellen und fötalen Rattendarmzellen.

Rattendarmzellen wurden in „sheets“ ausgesät, d.h. sie wurden vor dem Aussäen nur leicht auf- und abpipettiert, so daß kaum Einzelzellen vorlagen. Das hat den Vorteil, daß die L-Zellen noch in einem Zellverband vorliegen, und damit auch eine potentielle Polarisierung der GLP-1 Sekretgranula erhalten bleibt.

Am folgenden Tag wurde viermal mit 1,25 ml EBSS für 5 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur gewaschen. Das ur-

prünglich eingesetzte PBS wurde durch EBSS ersetzt, da sich viele GLUTag-Zellen während des Waschens ablösten. Anschließend wurde mit 4 %igem Formalin für 60 min bei



Raumtemperatur fixiert. Die Fixierzeit kann variiert werden, sollte aber mindestens 30 min betragen. Im Rahmen der durchgeführten Versuche wurden auch alternative Fixiermethoden getestet: ein Methanol/Aceton-Gemisch bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 min mit anschließender Rehydratation, Methanol bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 5 min mit anschließender Rehydratation und 4 %iges Glutaraldehyd in PBS für 60 min. Fixierung in 4 %igem Formalin ergab die besten Ergebnisse in Bezug auf die Strukturhaltung der Zellen. Im Anschluß wurde sechsmal mit 1,25 ml PBS bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Deckgläschen vorsichtig in eine feuchte Kammer transferiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1:10 verdünnter Blockierungslösung in 0,3 % Triton X-100/PBS für 30 min bei Raumtemperatur blockiert ( $\sim 150\text{ }\mu\text{l/Deckglas}$ ). Danach wurde die Blockierungslösung vorsichtig mit Filterpapier abgesaugt. Kontroll- bzw. erste Antikörper wurden in der entsprechenden Verdünnung auf den Deckgläschen verteilt (Verdünnung in 0,3 % Triton X-100/PBS). Die feuchte Kammer wurde mit Parafilm versiegelt. Anschließend wurde über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Bei Doppelmarkierungen wurde mit den beiden ersten Antikörpern gleichzeitig inkubiert. Die Antikörper wurden direkt vor der Applikation verdünnt und gemischt. Am folgenden Tag wurden die Deckgläschen in eine 6er Multiwellplatte transferiert und viermal mit PBS für 10 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Deckgläschen vorsichtig in eine feuchte Kammer transferiert. Mit dem verdünnten zweiten fluorophorkonjugierten Antikörper wurde für 1 h in einer feuchten Kammer bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in der Dunkelheit inkubiert ( $\sim 150\text{ }\mu\text{l/Deckglas}$ ). Bei Doppelmarkierungen wurde mit den zweiten Antikörpern gleichzeitig inkubiert. Die Antikörper wurden direkt vor der Applikation verdünnt und gemischt. Es wurde sechsmal mit 1,25 ml PBS für 5 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln gewaschen. Abschließend wurden die Präparate in  $40\text{ }\mu\text{l}$  DABCO/MOWIOL auf Objektträgern eingedeckelt. Dafür wurden 2,5 g MOWIOL, 6,0 g Glycin und 12 ml 0,2 M Tris/Cl pH 8,5 gemischt. Anschließend wurde der Stabilisator DABCO in einer Konzentration von 50 mg/ml unter erwärmen ( $\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) zugesetzt. Der Stabilisator DABCO verhindert das Ausbleichen der Präparate und ermöglicht damit eine stabile Lagerung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  über mehrere Monate. Anschließend erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Analyse mit einem Zeiss-Axioskop (Zeiss, Oberkochen, D).

### **2.2.3 Eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper**

Im folgenden sind die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper der GLP-1, IRS-1, M35 Fluoreszenzmarkierungen und der entsprechenden Doppelfluoreszenzmarkierungen an GLUTag-Zellen und an fötalen Rattendarmzellen tabellarisch aufgelistet.

Antigen	1. Antikörper	2. Antikörper	Blockierung	Kontrolle
<b>GLP-1</b>	Kaninchen-anti-human GLP-1 (7-37)-Antiserum (1:100 in 0,3 % Triton X-100/ PBS)	Ziege-anti-Kaninchen IgG*Cy3 (1:400 in 0,3 % Triton X-100/ PBS)	1:10 Ziege Normalserum in 0,3 % Triton X-100/PBS 60 min, RT	1:100 Kaninchen Normalserum in 0,3 % Triton X-100/PBS
<b>IRS-1</b>	Maus-anti-IRS-1 IgM (1:25 in 0,3 % Triton X-100/ PBS)	Kaninchen-anti-Maus IgM*FITC (1:100 in 0,3 % Triton X-100/ PBS)	1:10 Kaninchen Normalserum in 0,3 % Triton X-100/PBS 60 min, RT	1:25 unspez. Maus IgM in 0,3 % Triton X-100/ PBS
<b>M35</b>	Maus-anti-M35 IgM (1:100 in 0,3 % Triton X-100/ PBS)	Ziege-anti-Maus IgM*FITC (1:100 in 0,3 % Triton X-100/ PBS)	1:10 Ziege Normalserum in 0,3 % Triton X-100/PBS 60 min, RT	1:100 unspez. Maus IgM in 0,3 % Triton X-100/ PBS

**Tabelle 2-1:** Übersicht über die im Rahmen der GLP-1, IRS-1 und M35 Immunofluoreszenzmarkierungen an GLUTag Zellen eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper. Außerdem sind die eingesetzten Blockierungslösungen und Kontrollseren bzw. Antikörper aufgeführt. Alle Markierungen wurden an mit 4 %igem Formalin fixierten Zellen durchgeführt.

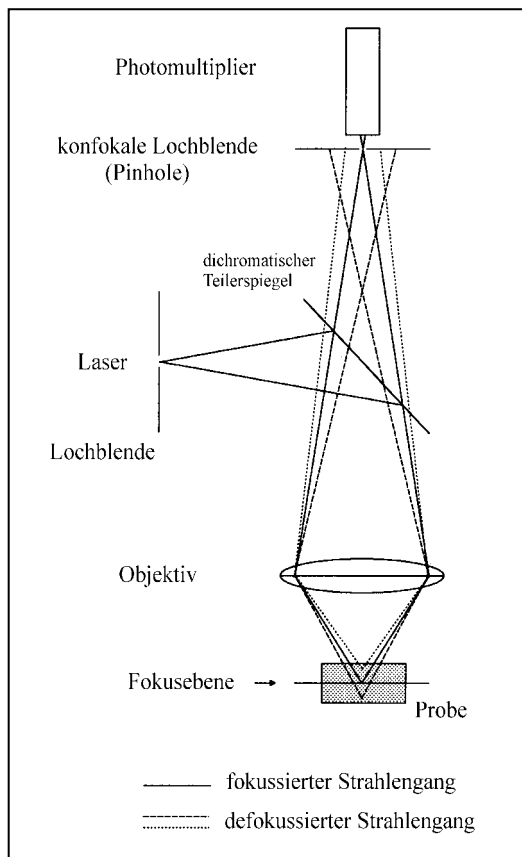
Antigen	1. Antikörper	2. Antikörper	Blockierung	Kontrolle
<b>GLP-1</b>	Kaninchen-anti-human GLP-1 (7-37)-Antiserum (1:100 in 0,3 % Triton X-100/PBS)	Ziege-anti-Kaninchen IgG*Cy3 (1:400 in 0,3 % Triton X-100/PBS)	1:10 Ziege Normalserum in 0,3 % Triton X-100/PBS 60 min, RT	1:100 Kaninchen Normalserum in 0,3 % Triton X-100/PBS
<b>IRS-1</b>	Maus-anti-IRS-1 IgM (1:25 in 0,3 % Triton X-100/PBS)	Kaninchen-anti-Maus IgM*FITC (1:100 in 0,3 % Triton X-100/PBS)	1:10 Kaninchen Normalserum in 0,3 % Triton X-100/PBS 60 min, RT	1:25 un spez. Maus IgM in 0,3 % Triton X-100/PBS
<b>GLP-1/ IRS-1</b>	Kaninchen-anti-human GLP-1 (7-37)-Antiserum (1:100 in 0,3 % Triton X-100/PBS)  Maus-anti-IRS-1 IgM (1:25 in 0,3 % Triton X-100/PBS)	Ziege-anti-Kaninchen IgG*Cy3 (1:400 in 0,3 % Triton X-100/PBS)  Ziege-anti-Maus IgM*FITC (1:100 in 0,3 % Triton X-100/PBS)	1:10 Ziege Normalserum in 0,3 % Triton X-100/PBS 30 min, RT	1:100 Kaninchen Normalserum/1:100 un spez. Maus IgM in 0,3 % Triton X-100/PBS
<b>GLP-1/ M35</b>	Kaninchen-anti-human GLP-1 (7-37)-Antiserum (1:100 in 0,3 % Triton X-100/PBS)  Maus-anti-M35 IgM (1:100 in 0,3 % Triton X-100/PBS)	Ziege-anti-Kaninchen IgG*Cy3 (1:400 in 0,3 % Triton X-100/PBS)  Ziege-anti-Maus IgM*FITC (1:100 in 0,3 % Triton X-100/PBS)	1:10 Ziege Normalserum in 0,3 % Triton X-100/PBS 60 min, RT	1:100 Kaninchen Normalserum/1:100 un spez. Maus IgM in 0,3 % Triton X-100/PBS

**Tabelle 2-2:** Übersicht über die im Rahmen der GLP-1 und IRS-1 Immunofluoreszenzmarkierungen und GLP-1/IRS-1 und GLP-1/M35 Doppel-Immunofluoreszenzmarkierungen an fötalen Rattendarmzellen eingesetzte Primär- und Sekundärantikörper. Außerdem sind die eingesetzten Blockierungslösungen und Kontrollseren bzw. Antikörper aufgeführt. Alle Markierungen wurden an mit 4 %igem Formalin fixierten Zellen durchgeführt.

## 2.3 KONFOKALE LASER-SCANNING MIKROSKOPIE (CLSM)

### 2.3.1 Prinzip der CLSM

Die Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) stellt eine mikroskopische Methode dar, die es erlaubt, biologisches Material nicht-invasiv in seiner Gesamtheit dreidimensional abzubilden. Die CLSM bietet gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie zwei



**Abb. 2-3:** Schematische Darstellung des Prinzips der Konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie (mit freundlicher Genehmigung von G. Vielhaber)

entscheidende Vorteile: Zum einen werden durch den Einsatz einer speziellen Blende (Pinhole) nur solche Strukturen scharf abgebildet, die im Fokus liegen, während alle anderen Ebenen ausgeblendet werden. Dadurch werden die laterale Auflösung um das 1,4 fache und der Kontrast bis auf das 100-fache gesteigert (Cullander, 1998). Eine scharfe Abbildung in axialer (z-) Richtung ist in Proben dicker als  $0,2 \mu\text{m}$  bei der konventionellen Mikroskopie nicht möglich. Zum anderen können Proben optisch geschnitten werden, indem man schrittweise in die Tiefe (z-Scan) der Objekte hineinscant. Der gewonnene Bildstapel wird anschließend im Computer zu einer dreidimensionalen Darstellung zusammengesetzt (Abb. 2-4). Die Abb. 2-3 stellt das Prinzip der CLSM schematisch dar.

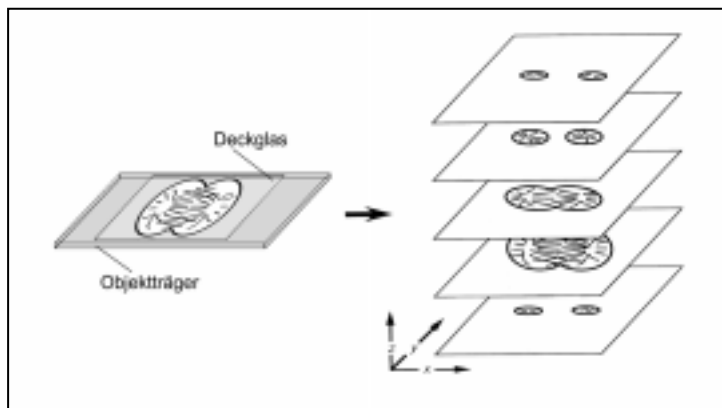
### 2.3.2 Vorbereiten der Präparate

Die CLSM wurde zur Untersuchung der dreidimensionalen Verteilung von GLP-1 Sekretgranula in GLUTag Zellen und fötalen Rattendarmzellen (FRIC) eingesetzt.

Deckglaskulturen der Zellen wurden mit 4 %igem Formalin fixiert und sukzessive mit Kaninchen-GLP-1 (7-37)-Antiserum und einem FITC- oder Cy3-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert (siehe Kapitel 2.2 IMMUNOFLUORESZENZMIKROSKOPIE).

### 2.3.3 Geräteeinstellungen

Die Untersuchungen wurden mit einem CLSM MRC-600 (Bio-RAD, München, D) durchgeführt, das mit einem Argon/Krypton-Ionen-Laser (488/568/647 nm) ausgestattet ist. Die Aufnahmen erfolgten im *slow scan mode (accumulate mode)* bei 488 nm für FITC bzw. 568 nm für Cy3 (Filterset K1/K2). Es wurde ein 63 x Ölimmersionsobjektiv (NA = 1,4) verwendet (Zeiss). Die Bildverarbeitung erfolgte mit der Imaris 2.1 Software (Bitplane, Zürich, CH).



**Abb. 2-4:** Schematische Darstellung der dreidimensionalen Rekonstruktion der einzelnen Bildstapel nach CLSM (mit freundlicher Genehmigung von G. Vielhaber).

## 2.4 SEKRETIONSSTUDIEN

### **2.4.1 GLP-1 Sekretionsstudien an der GLUTag-Zelllinie**

GLUTag-Zellen wurden in DMEM ohne Phenolrot in 48er Multiwellplatten ausgesät (40.000 Zellen/well) und für 24-48 h in 10 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei 37 °C gehalten. Es wurde Phenolrot-freies Medium gewählt, da der farbige Indikator im GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> EIA, der zur Quantifizierung des Peptids eingesetzt wurde, stört. Die zu untersuchenden Substanzlösungen wurden angesetzt, entsprechend verdünnt und im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Vor dem Versuch wurden die Zellen dem Brutschrank entnommen und 1-2 x mit EBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzlösungen (600 µl) im Brutschrank für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Nach 2 h wurden die Zellen dem Brutschrank entnommen und das Medium vorsichtig in eine vorbereitete deep-well Platte auf Eis überführt, in der 60 µl 1 %ige Trifluoressigsäure pro well vorgelegt wurden.

### **2.4.2 Reverse Festphasenextraktion mit OASIS-Extraktionsplatten**

Zur reversen Festphasenextraktion wurden OASIS-Säulen der Firma Waters eingesetzt. Die 96-well Extraktionsplatte wurde auf eine Vakuumstation aufgesetzt und mit jeweils 1 ml Reagenz A pro Säule beschickt. Die Flußrate sollte dabei 10 ml/min nicht überschreiten. Nach dem Trockenlaufen der Säulen wurde das Vakuum abgeschaltet. Nicht benötigte Säulen sollten mit einer Verschlussfolie vor Kontamination geschützt werden. Anschließend wurden die Extraktionssäulen mit jeweils 1 ml Reagenz B äquilibriert (maximal 10 ml/min). Die Säulen wurden mit den Proben (600 µl) bei einer maximalen Flußrate von 2 ml/min beladen. Anschließend wurde mit jeweils 1 ml Reagenz B pro Säule gewaschen (maximal 10 ml/min). Der Auffangbehälter wurde entnommen und durch eine 96er deep-well Platte (1 ml/well) ersetzt. Die Elution erfolgte mit 600 µl Reagenz A bei einer maximalen Flußrate von 2 ml/min. Anschließend wurden 500 µl Aliquots der Eluate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Eluate sollten vor dem Aliquotieren auf- und abpipetiert werden, um eine gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten. Die Proben wurden danach entweder bei -20 °C gelagert oder direkt in einem Vakuumkonzentrator (Bachofer, Reutlingen, D) getrocknet. Der Trocknungsprozeß sollte regelmäßig überprüft werden, um ein zu starkes Eintrocknen der Proben zu verhindern. Die Proben wurden nach dem Trocknen bei -20 °C gelagert. Die anschließende Quantifizierung erfolgte mit einem kommerziellen GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> EIA.

**Reagenz A:** 80 % Isopropanol  
0,1 % Trifluoressigsäure

**Reagenz B:** 0,1 % Trifluoressigsäure in  
dd H<sub>2</sub>O

### **2.4.3 GLP-1 (7-36) NH<sub>2</sub> Enzym Immunoassay (EIA)**

#### ***Prinzip des Assay***

GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> Antikörper, biotinyliertes GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> und nicht-biotinyliertes GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> (Standard oder zu bestimmende Probe) werden gemeinsam in ein well pipettiert und geschüttelt. Der GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> Antikörper bindet an die speziell behandelte Oberfläche der wells. Das biotinylierte GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> konkurriert mit den Standards bzw. den zu untersuchenden Proben um die Bindungsstellen des Antikörpers. Nach der Inkubation wird ungebundenes biotinyliertes GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> durch mehrmaliges Waschen entfernt. Die anschließend hinzugefügte Streptavidin-Meerrettichperoxidase (SA-MP) bindet an den immobilisierten Komplex zwischen Antikörper und biotinyliertem GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub>. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wird überschüssige SA-MP durch mehrmaliges Waschen entfernt. Anschließend wird ein Substrat (TMB) hinzugefügt, das mit der gebundenen SA-MP eine Farbreaktion eingeht. Die Farbintensität korreliert mit der Menge an biotinyliertem GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> das an den Antikörper gebunden ist. Wenn mehr nicht-biotinyliertes GLP-1 (Standard oder zu bestimmende Probe) um die limitierte Menge an Antikörper konkurriert, kann weniger biotinyliertes GLP-1 immobilisiert werden. Demnach wird auch weniger Farbe vom Substrat produziert.

#### ***Vorbereiten der Lösungen und Standards***

Der konzentrierte Assay-Puffer wurde mit sterilem, deionisiertem reinem Wasser (18 MΩ) auf 1000 ml verdünnt. Anschließend wurde der lyophilisierte GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> Standard in 1 ml Assay-Puffer aufgenommen und gevortext. Die Konzentration dieser Stammlösung betrug 1 ng/ml. Lyophilisiertes GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> Antiserum und lyophilisiertes biotinyliertes GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> wurden in 5 ml Assay-Puffer aufgenommen und ebenfalls gevortext.

Die GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> Standards wurden in phenolrotfreiem DMEM verdünnt (0,016 bis 10 ng/ml) und über die OASIS-Säulen gegeben (2.4.2 Reverse Festphasenextraktion mit OASIS-Extraktionsplatten).

#### ***Start des Assays***

Die getrockneten Proben wurden in 150 µl und die lyophilisierten Standards in 500 µl Assay-Puffer aufgenommen und gevortext. Alle Proben und Standards wurden für 1 min im Ultraschallbad behandelt und erneut gevortext. Die wells der Immunplatte wurden jeweils

mit 50 µl der Standards bzw Proben beschickt. Dann wurden zuerst 25 µl GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub>-Antiserum und anschließend 25 µl biotinyliertes GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> zugesetzt. Die Immunplatte wurde vorsichtig geschüttelt und mit einer Folie abgeklebt. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug 2 h.

### ***Enzymatische Detektion***

Die Folie wurde von der Immunplatte abgezogen und der Inhalt mit einer schnellen Handbewegung ausgeschüttet. Die Immunplatte wurde anschließend fünfmal mit Assay-Puffer gewaschen. 100 µl einer vorbereiteten SA-MP-Lösung (6 µl SA-MP in 12 ml Assay-Puffer) wurden in jedes well pipettiert und die Immunplatte mit Folie abgeklebt. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut fünfmal mit Assay-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl TMB-Lösung wurde für 30 bis 60 min bei Raumtemperatur unter Ausschluß von Licht inkubiert. Die Farbe in den wells wurde nach 20 min alle 5-10 min überprüft. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Reaktion mit 100 µl 2 N HCl abgestoppt. Die photometrische Absorptionsmessung erfolgte bei 450 nm nach spätestens 20 min.

### **2.4.4 MTS-Test**

#### ***Prinzip des Assays***

Um mögliche toxische Effekte der eingesetzten Substanzen auf GLUTag-Zellen ausschließen zu können, wurde ein Zellproliferationstest durchgeführt. Der dafür verwendete MTS-Test beruht auf der Reduktion des Tetrazolium-Derivats MTS durch Dehydrogenasen matabolisch aktiver Zellen. Das gebildete Formazan wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt.

#### ***Durchführung***

In ein lichtgeschütztes 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 21 ml Dulbecco's PBS-Lösung (DPBS) überführt. Anschließend wurden 42 mg MTS-Reagenz dazugegeben und für 15 min mit einem Magnetrührer bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt. Darauf wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt und sterilfiltriert. Die Lösung wurde aliquotiert und bei - 20°C gelagert.

GLUTag-Zellen wurden in eine 96-well Platte ausgesät (40.000/well) und nach einer Ruhephase von mindestens 24 h für 24 h mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Nach der Inkubation wurden 2,0 ml MTS-Lösung und 100 µl PMS-Lösung gemischt und vorsichtig geschüttelt. Der Überstand über den Zellen wurde abgenommen und 20 µl der



MTS/PMS-Lösung in jedes well pipettiert. Anschließend wurde für 3 h unter 10 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 490 nm photometrisch bestimmt.

#### **2.4.5 Statistik**

Die statistische Überprüfung der Ergebnisse auf Signifikanz erfolgt mit Hilfe des t-Tests nach Student. Dazu wurde das Statistik-Programm Sigma Stat eingesetzt (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA). Das niedrigste Signifikanzniveau wurde auf  $P < 0,05$  festgelegt. Die Angabe der Werte erfolgte als Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Anzahl der Versuche ist in der jeweiligen Grafik angegeben.

### **2.5 IMMUNOPRÄZIPITATION**

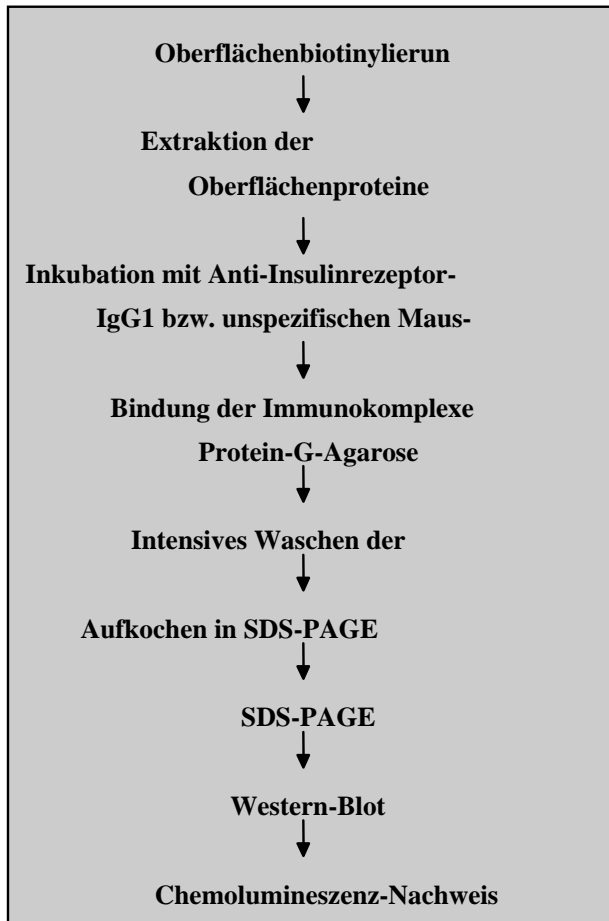
#### **2.5.1 Prinzip der Immunopräzipitation**

Bei der Immunopräzipitation werden spezifische Antikörper benutzt, um Proteinantigene aus komplexen Mischungen selektiv auszufällen. Das in diesem Fall mit Biotin markierte Antigen wird mit einem Überschuß an Antikörpern in Immunokomplexen gebunden. Die Immunokomplexe präzipitieren bei der geringen Konzentration des Antigens nicht. Sie müssen an die bakteriellen Ig-Rezeptoren von Protein G, die dazu an Agarose gekoppelt sind, gebunden und in dieser Form präzipitiert werden. Bei der Auswahl des Fällungs- ("sandwich")-Reagenz sind die relativen Affinitäten von Protein G aus Streptococcus zu den Immunoglobulinklassen und in diesem Fall auch zu den IgG-Subklassen verschiedener Spezies zu berücksichtigen. Nach der Sedimentierung der an Protein-G-Agarose gebundenen Immunokomplexe durch Zentrifugation folgen mehrere Waschschrte mit variierenden Konzentrationen an Salzen bzw. Detergentien. Dabei wird der größte Teil der unspezifisch adsorbierten bzw. mitgefällten Proteine entfernt. Der nächste Schritt ist die Dissoziation und Abtrennung der Immunokomplexe von der Protein-G-Agarose und die Vorbereitung für die anschließende Auftrennung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Abschließend erfolgt ein Western-Blot, bei dem die Proteine auf Nitrozellulose transferiert werden. Der Nachweis der biotinylierten Proteine erfolgt mit Luminol.

#### **2.5.2 Immunopräzipitation von Insulinrezeptoren**

Eine dicht bewachsene 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit GLUTag Zellen wurde dreimal mit 4 ml EBSS gewaschen. Anschließend wurde für 30 min bei 37 °C mit 4 ml 0,1 mg/ml

Biotinamidocaprinsäure 3-sulfo-N-hydroxy-succinimidester in EBSS biotinyliert. Die Oberflächenbiotinylierung wurde durch Zugabe von 4 ml Kultur-Medium bei Raumtemperatur gestoppt. Danach wurde zweimal mit 4 ml EBSS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 2 ml Lysispuffer für 10 min bei Raumtemperatur extrahiert. Die Lösung wurde für 5 min bei Raumtemperatur und 20.000 x g zentrifugiert. Zu je 1 ml Zellhomogenat wurden 2 µg unspezifische Maus IgG1 oder 2 µg Anti-Insulinrezeptor



**Abb. 2-5:** Schematische Darstellung der Immunopräzipitation von Insulinrezeptoren nach Oberflächenbiotinylierung an GLUTag Zellen.

spezifische Maus IgG1 gegeben. Die Menge an Antikörpern war entscheidend, da zu hohe Konzentrationen zur Erhöhung des Hintergrunds durch unspezifische Bindung und Mitfällung irrelevanter Proteine geführt hätte. Zu geringe Konzentrationen ergaben keine ausreichende Fällung. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden jeweils 20 ml Protein-G-Agarose hinzugefügt und für 1 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur und 20.000 x g für 10 s zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen und mehrmals mit unterschiedlichen Puffern gewaschen: 2 x mit 0,8 ml PBS, 0,8 ml Puffer A, 0,8 ml Puffer B, 1 x mit 0,8 ml PBS und abschließend 1 x mit 0,8 ml 1:10 verdünnter TBS-Lösung zum Entsalzen. Der letzte Waschschrift erfolgte in einem

Puffer ohne Detergentien, da besonders nichtionische Detergentien bei der anschließenden Denaturierung und Ladung der Proteine durch SDS stören würden. Die Sedimente wurden in 20 µl 1,5 x Probenpuffer für 5 min aufgekocht und danach für 2 min bei Raumtemperatur und 20.000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden auf ein 10 % SDS-PAGE Gel aufgetragen (200 V für 45 min). Anschließend wurde bei 100 V für 60 min auf Nitrozellulose transferiert (Western-Blot). Daraufhin wurde für 60 min bei Raumtemperatur unter Schütteln geblockt. Mit 1:100 in Blockierungslösung verdünnter HRP-Streptavidin-Lösung (10 µg/ml) wurde für

30 min inkubiert und anschließend 5 x mit 0,3 % Tween-20 in TBS für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Abschließend wurde 5 x mit PBS für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Die biotinylierten Proteine wurden mit Luminol nachgewiesen.

**Lysispuffer:** TBS  
1 % Triton X-100  
2 mM PMSF  
5 mM IAA

**Puffer B:** PBS  
1 % Triton X-100  
0,5 % NaDOC  
0,3 % Ovalbumin

**Puffer A:** PBS  
1 % Triton X-100  
0,5 % NaDOC  
2 % BSA

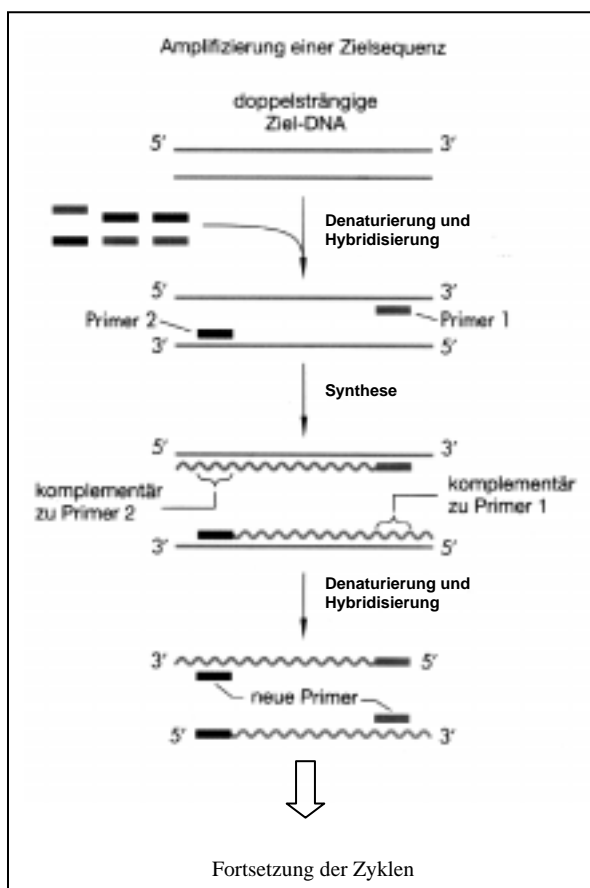
## **2.6 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)**

### **2.6.1 Prinzip der PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt es, beliebige DNA-Abschnitte ohne Verwendung von Restriktionsenzymen, Vektoren und Wirtszellen zu amplifizieren. Man benötigt dazu zwei Oligonucleotide (Primer), die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren, ausreichende Mengen der vier Desoxynucleosid-triphosphate und eine spezielle, wärmebeständige DNA-Polymerase. Zunächst wird der Doppelstrang durch Erhitzen in Einzelstränge zerlegt; dann läßt man die Lösung etwas abkühlen, um die Hybridisierung der Primer zu ermöglichen. Von diesen ausgehend werden nun in beide Richtungen komplementäre DNA-Stränge neu synthetisiert. Dieser Zyklus wird mit derselben Reaktionsmischung 20-30 mal wiederholt. Schon nach dem dritten Zyklus bilden sich Doppelstränge, deren Länge dem Abstand der Primer entspricht. Ihr Anteil erhöht sich mit jedem Zyklus auf etwa das Doppelte, bis schließlich fast alle der neu synthetisierten Abschnitte die richtige Länge haben (Abb. 2-6).

### **2.6.2 RNA-Isolation aus GLUTag-Zellen**

5-10 x 10<sup>6</sup> GLUTag Zellen wurden in 1 ml TRIZOL<sup>®</sup>-Reagenz suspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben und nach 2 min bei 12.000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die RNA im wässrigen Überstand wurde mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert (10 min, 23 °C). Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 12.000 x g für 10 min bei 4 °C. Das RNA-Sediment wurde 1 x mit 75% Ethanol gewaschen, anschließend luftgetrocknet und in Wasser aufgenommen.



Die RNA wurde für 15 min bei 23 °C mit 1 U Deoxyribonuclease I (DNase I) pro µg RNA inkubiert. Die DNase wurde durch den Zusatz von 1 µl 25 mM EDTA-Lösung inaktiviert und das Gemisch für 10 min bei 65 °C erhitzt. Alternativ wurde die RNA nach einer Phenolextraktion gefällt und in Wasser resuspendiert. Als Positivkontrolle wurde Gesamt-RNA aus Mäusehirn verwendet.

**Abb. 2-6:** Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerase-Kettenreaktion (aus: Rekombinante DNA; Watson et al., Spektrum Akad. Verlag, 1997).

### 2.6.3 Erststrangsynthese

5 µg Gesamt-RNA wurden in einem Endvolumen von 12 µl mit 0,5 µg Oligo dT<sub>(12-18)</sub> Primer versetzt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden dem Ansatz 4 µl 5 x Transkriptionspuffer, 2 µl 100 mM DTT und 1 µl 10 mM dNTP Lösung zugegeben und 2 min bei 42 °C inkubiert. Die cDNA Synthese wurde anschließend durch Zugabe von 200 U Superscript II initiiert und für 90 min bei 42 °C durchgeführt. Kontrollversuche wurden ohne Zugabe von Superscript II durchgeführt.

### 2.6.4 PCR-Reaktion

Die Amplifikation von cDNA mittels PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl in folgendem Standardansatz:

DNA	x ng	Nucleotide (dNTPs)	200 µM
Primer I	0,2 µM	10 x PCR-Puffer	5 µl
Primer II	0,2 µM	Taq DNA-Polymerase	2,5 U

Die PCR-Reaktion wurde in einem Robocycler (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Für die Amplifikation von M<sub>1</sub> bis M<sub>5</sub> cDNA wurde nach einer ersten Denaturierung bei 94 °C für 3 min folgendes Zyklusprogramm eingesetzt:

Denaturierung	94 °C	45 s
Hybridisierung	52 °C	1 min
Synthese	72 °C	1 min
Zyklen	34	

Zur Reamplifikation von M<sub>5</sub> cDNA wurden 5 µl des ersten PCR-Produkts eingesetzt und 25 Zyklen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

Gen	Primer	Position	Größe	Accession number
M <sub>1</sub>	5'-CTGGTTTCCTTCGTTCTCTG-3' 5'-GCTGCCTTCTTCTCCTTGAC-3'	(593-612) (1233-1214)	à 641	J 04192
M <sub>2</sub>	5'-GGCAAGCAAGAGTAGAATAAA-3' 5'-GCCAACAGGATAGCCAAGATT-3'	(633-653) (1184-1164)	à 552	M 16404
M <sub>3</sub>	5'-TTCTCGAAGCTGTAGCAGCTAT-3' 5'-GCAGGTTATCTGAGGACGGTAG-3'	(1607-1628) (1917-1896)	à 310	M 16408
M <sub>4</sub>	5'-AGTGCTTCATCCAGTTCTTGTTCCA-3' 5'-CACATTCATTGCCTGTCTGCTTTG-3'	(543-566) (1052-1029)	à 510	M 16409
M <sub>5</sub>	5'-CTGGTCATCCTCCCGTAGAA-3' 5'-GCATGATTTTCACCTTTCGAC-3'	(1780-1799) (2180-2160)	à 400	M 22926

Zur Amplifikation eines Insulinrezeptor cDNA Fragments wurde ein kommerziell erhältliches spezifisches Primerpaar eingesetzt (Biagnostik, Göttingen, D). Die PCR-Reaktion erfolgte unter den oben aufgeführten Bedingungen mit 34 Zyklen.

### **2.6.5 Analyse von PCR-Fragmenten**

Die amplifizierte DNA wurde auf 1,5 %igen Agarosegelen in 1 x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel und der Puffer enthielten 0,4 µg/ml Ethidiumbromid. Die Spannung betrug 100 V, und die Elektrophoresezeiten lagen zwischen 30 und 60 min.

**2.7 CHEMIKALIEN- UND MEDIENVERZEICHNIS**

**ZELLKULTUR**

DMEM, mit Phenolrot, mit 4,5 g/l Glukose, mit Pyridoxin, ohne Natriumpyruvat	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D
HBSS, ohne Phenolrot, ohne Glukose	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
FCS (nichthitzeinaktiviert)	Seromed, Berlin, D
FCS (nichthitzeinaktiviert)	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D
FCS (hitzeinaktiviert)	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D
Trypsin-EDTA (1 x) in HBSS	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D
Enzyme Free Cell Dissociation Solution	Speciality Media, Lavallette, NJ, USA
Kollagenase Typ H (C-8051)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Hyaluronidase Typ II (H-2126)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Deoxyribonuclease I (D-5025)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 IU/10.000 µg)	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D

**IMMUNOFLUORESZENZMIKROSKOPIE**

EBSS ohne BSA ohne Glukose, ohne Phenolrot	Speciality Media, Lavallette, NJ, USA
Paraformaldehyd 10%	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Maus-anti-IRS-1 IgM	Transduction Laboratories, Mamhead, UK
Kaninchen-anti-human GLP-1 (7-37)-Antiserum	Peninsula Laboratories, Merseyside, UK
Maus-anti-M35 IgM	Viva Diagnostika, Köln, D
Kaninchen Normalserum	Dianova, Hamburg, D
Ziege Normalserum	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Ziege-anti-Mouse IgM*FITC	Dianova, Hamburg, D
Ziege-anti-Kaninchen IgG*Cy3	Dianova, Hamburg, D
Unspezifische Maus IgMκ	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Kaninchen-anti-Maus IgM*FITC	Dianova, Hamburg, D
DABCO	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
MOWIOL 4-88	Calbiochem, Bad Soden, D

### ***SEKRETIONSSTUDIEN***

DMEM ohne Phenolrot, mit 4,5 g/l Glukose	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Trypsin-EDTA (1 x) in HBSS	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D
Enzymatic cell dissociation light (ECD light)	Speciality Media, Lavallette, NJ, USA
PDBU (MW: 504,6)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Forskolin (MW: 410,5)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
IBMX (MW: 222,2)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
GIP (MW: 4983,7)	Bachem, Heidelberg, D
Bombesin (MW: 1619,9)	Research Biochemicals, Deisenhofen, D
Bethanechol (MW: 196,7 anhydr.)	Research Biochemicals, Deisenhofen, D
Atropinsulfat (MW: 676,8 anhydr.)	Research Biochemicals, Deisenhofen, D
Oxotremorinsesquifumarat (MW: 380,4)	TOCRIS, Köln, D
GLP-1 (7-36)NH <sub>2</sub>	Bachem, Heidelberg, D
Lyophilisiertes Ratteninsulin	DRG Instruments, Marburg, D
MTS-Reagenz	Promega, Madison, WI, USA
PMS-Lösung	Promega, Madison, WI, USA

### ***IMMUNOPRÄZIPITATION***

Mouse IgG1, Kappa (MOPC-31c)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Laurylsulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Biotinamidocaprinsäure 3-sulfo-N-hydroxy-succinimidester	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Biotinylierter SDS Molekulargewicht-Standard	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Monoklonaler Insulinreceptor-Anikörper (AB-3)	Calbiochem, Bad Soden, D
TBS (TRIZMA <sup>®</sup> )	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
PMSF (MW: 174,2)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
NaDOC	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Ovalbumin (Huhn)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D

### ***POLYMERASE-KETTENREAKTION***

TRIZOL <sup>®</sup> -Reagenz	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D
Deoxyribonuclease I (Amplification Grade)	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D
OligodT (12-18) Primer (0,5 µg/µl)	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D
DTT	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D

DNTP-Mix (10 mM)	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D
SuperScript II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D
Taq DNA-Polymerase (Rekombinant)	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D
Ethidiumbromid	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D
TAE-Puffer (10 x)	GIBCO, Life Technologies, Eggenstein, D

Alle Chemikalien waren, sofern nicht anders angegeben, vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

### **2.8 GEFAHRSTOFFE**

Bei allen verwendeten Chemikalien wurden die R- und S-Sätze, sowie die Entsorgungshinweise der jeweiligen Hersteller beachtet. Waren diese nicht vorhanden, so wurden die Chemikalien mit äußerster Vorsicht gehandhabt, und als gesundheitsgefährdend behandelt. Organische Lösungen wurden in entsprechenden Sammelbehältern nach Schadstoffkategorien getrennt.

Biologisches Material und damit kontaminierte Arbeitsmaterialien wurden nach dem Gebrauch autoklaviert. Lösungen mit kanzerogenen oder mutagenen Stoffen wurden dem Sondermüll zugeführt. Die gentechnischen Arbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 der Abteilung Molekularbiologie der Lilly Forschung GmbH durchgeführt, das bei der Hansestadt Hamburg in der Umweltbehörde im Amt für Technik und Umweltschutz registriert ist.



### **3. ERGEBNISSE**

Die Beschreibung der Ergebnisse gliedert sich inhaltlich in fünf Abschnitte:

- methodische Evaluierung, bei der die Aufreinigung und Stabilität von GLP-1, die Wachstums- und Sekretionseigenschaften der GLUTag-Zelllinie und die Modifikationen der Präparation fötaler Rattendarmzellen (FRIC) beschrieben werden;
- GLP-1 Fluoreszenzmarkierungen und Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) an der GLUTag-Zelllinie und an fötalen Rattendarmzellen (FRIC);
- GLP-1 Sekretionsstudien an der GLUTag-Zelllinie;
- Untersuchungen zu muskarinergen Rezeptoren an der GLUTag-Zelllinie und an fötalen Rattendarmzellen (FRIC);
- Untersuchungen zu Insulinrezeptoren an der GLUTag-Zelllinie und an fötalen Rattendarmzellen (FRIC).

#### **3.1 METHODISCHE EVALUIERUNG**

##### **3.1.1 GLP-1 Aufreinigung und Stabilität**

###### **3.1.1.1 <sup>125</sup>J-GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> Wiederfindungsrate**

Im Rahmen der GLP-1 Sekretionsversuche an der GLUTag-Zelllinie wurde GLP-1 nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden mit der zu untersuchenden Substanz mittels reverser Festphasenextraktion aus dem Versuchsmedium extrahiert. Das in der Literatur beschriebene Verfahren setzt Waters SEP-PAK C-18 Säulen ein. Für diese Säulen wird eine GLP-1 Wiederfindungsrate zwischen 80 und 97 % angegeben (Brubaker und Vranic, 1987).

Für die vorliegenden Versuche wurde das Extraktionsverfahren durch den Einsatz von Waters Oasis HLB Extraktionssäulen modifiziert. Das Oasis HLB Säulenfüllmaterial besteht aus einem Copolymer mit einem ausgewogenen Verhältnis an hydrophilen und lipophilen Gruppen. Laut Herstellerangaben ermöglicht dieses Material hohe und reproduzierbare Wiederfindungsraten. Außerdem soll ein Trockenlaufen der Säulen vor der Probenaufgabe ohne negativen Einfluß auf die Wiederfindungsrate bleiben. Um diese Aussagen zu überprüfen, wurde die Wiederfindungsrate mit <sup>125</sup>J-GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> bestimmt. Dazu wurde ein Probenvolumen von 600 µl eingesetzt, das mit 600 µl und 1 ml eluiert wurde.

***<sup>125</sup>J-GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> Wiederfindungsrate auf Oasis HLB Einzelsäulen***

Beim Einsatz von Oasis-Einzelsäulen auf einer Vakuumstation lag die Gesamt-Wiederfindungsrate beider Elutionsschritte bei  $90,3 \pm 0,9$  % (n=6) (Tabelle 3-1).

Der Verlust bei Probenaufgabe und erstem Waschschrift betrug  $3,4 \pm 0,4$  % und  $1,1 \pm 0,1$  %. Der Rückstand von markiertem GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> auf der Säule nach Elution lag bei  $3,2 \pm 0,9$  %.

Zugesetztes nichtradioaktiv markiertes GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> (2 ng/ml, 0,5 ng/ml und 0,03 ng/ml) hatte keinen Einfluß auf die Wiederfindungsrate von <sup>125</sup>J-GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub>. Auch der Einsatz unterschiedlicher <sup>125</sup>J-GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> Aktivitäten (33.000 cpm und 55.000 cpm pro Säule) beeinflusste die Wiederfindungsrate nicht. Der beim Pipettieren auftretende Verlust von <sup>125</sup>J-GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> in der Pipettenspitze wurde mit 5 % bestimmt.

<b>Oasis Einzelsäulen auf Vakuumstation</b>		
	Wiederfindungs- rate (%)	SEM
Probenaufgabe (600 µl)	3,4 %	± 0,4
Reagenz B (1 ml)	1,1 %	± 0,1
ELUTION 1 (600 µl)	85,9 %	± 0,7
ELUTION 2 (1 ml)	4,4 %	± 1,1
Reagenz B (1 ml)	2,0 %	± 1,0
Säulen	3,2 %	± 0,9
<b>Wiederfindungs- rate Gesamt</b>	<b>90,3 %</b>	<b>± 0,9</b>

**Tabelle 3-1:** <sup>125</sup>J-GLP-1(7-36)NH<sub>2</sub> Wiederfindungsrate auf Oasis HLB Einzelsäulen (n = 6). Pro Säule wurden 33.000 cpm und 55.000 cpm eingesetzt.

***<sup>125</sup>J-GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> Wiederfindungsrate auf Oasis HLB Extraktionsplatten (96-well)***

Im Rahmen der GLP-1 Sekretionsstudien an der GLUTag-Zelllinie wurden Oasis-Extraktionsplatten im 96-well Format eingesetzt. Diese wiesen bei der ersten Elution eine Wiederfindungsrate von  $74,6 \pm 0,9$  %,  $70,8 \pm 1,7$  % und  $73,5 \pm 1,5$  % (n=4) bei drei aufeinanderfolgenden Bestimmungen auf der gleichen Säule auf (Tabelle 3-2). Die Extraktionsplatten können also mindestens dreimal direkt hintereinander verwendet werden,

ohne daß die Wiederfindungsrate negativ beeinflußt wird. Die Gesamt-Wiederfindungsrate, d.h. die Summe aus erster und zweiter Elution betrug  $76,0 \pm 0,9$  %. Die Differenz von fast 20 % bei Oasis-Extraktionsplatten im Vergleich zu Oasis-Einzelsäulen kann durch das erforderliche Umpipettieren in deep-well Platten erklärt werden. Es bleibt unklar, ob der Verlust in deep-well Platten nur bei  $^{125}\text{J-GLP-1 (7-36)NH}_2$  auftritt oder auch bei nichtmarkiertem GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> zu beobachten ist. Trotz der im Vergleich zu Einzelsäulen geringen Wiederfindungsrate der Extraktionsplatten sind die Säulen aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für die GLP-1 Aufreinigung in 96-well Extraktionsplatten geeignet.

<b>Oasis-Extraktionsplatte (96-well) auf Vakuumstation</b>			
		Wiederfindungs- rate (%)	SEM
Probenaufgabe A	(600 µl)	2,9 %	± 0,2
ELUTION 1	(600 µl)	74,6 %	± 0,9
ELUTION 2	(1 ml)	2,8 %	± 0,1
Probenaufgabe B	(600 µl)	3,4 %	± 0,4
ELUTION 1	(600 µl)	70,8 %	± 1,7
ELUTION 2	(1 ml)	3,8 %	± 0,2
Probenaufgabe C	(600 µl)	3,1 %	± 0,1
ELUTION 1	(600 µl)	73,5 %	± 1,5
ELUTION 2	(1 ml)	3,2 %	± 0,1
Wiederfindungsrate Gesamt A		77,3 %	± 0,9
Wiederfindungsrate Gesamt B		73,3 %	± 1,6
Wiederfindungsrate Gesamt C		76,7 %	± 1,4
Wiederfindungsrate Gesamt (Mittelwert)		<b>76,0 %</b>	<b>± 0,9</b>

**Tabelle 3-2:**  $^{125}\text{J-GLP-1(7-36)NH}_2$  Wiederfindungsrate auf Oasis HLB Einzelsäulen (n = 4). Pro Säule wurden 33.000 cpm und 55.000 cpm eingesetzt. Die Wiederfindungsrate wurde dreimal direkt hintereinander auf der gleichen Säule bestimmt.

### 3.1.1.2 Stabilität von GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub>

Ziel dieser Studien war es den Einfluß von Kälte, Hitze und Ultraschall auf die Stabilität von GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> zu untersuchen. Dazu wurde das Peptid bei -80 °C eingefroren, aufgetaut und die Wiederfindungsrate mittels EIA bestimmt. Das aufgetaute GLP-1 wurde bei -80 °C eingefroren, aufgetaut und erneut quantitativ bestimmt. Zur Untersuchung der Hitzestabilität wurde GLP-1 bei 100 °C für 10 min erhitzt. Diese Untersuchungen waren von Bedeutung, da das Peptid nach reverser Festphasenextraktion eingefroren wurde. Außerdem wurde GLP-1 nach dem Trocknen in einem Vakuumkonzentrator in EIA-Puffer aufgenommen und im Ultraschallbad behandelt.

In Tabelle 3-3 sind die Stabilitätseigenschaften von GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> zusammengefaßt. GLP-1 konnte problemlos zweimal eingefroren und wiederaufgetaut werden ohne negative Beeinflussung der Stabilität. Dagegen führte das Erhitzen des Peptids zu Stabilitätsverlusten - nach 10 min bei 100 °C wurden nur noch 43,6 ± 3,3 % des Peptids wiedergefunden (n = 6).

<b>Stabilität von GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub></b>		
	Wiederfindungs- rate (%)	SEM
1 x Einfrieren (-80 °C)	97,5 %	± 5,8
2 x Einfrieren (-80 °C)	97,1 %	± 9,0
Erhitzen für 10min (100 °C)	43,6 %	± 3,3
Sonifier (30 s)	98,9 %	± 5,3
Sonifier (60 s)	92,4 %	± 7,4
Sonifier (3 min)	99,1 %	± 3,2

**Tabelle 3-3:** Stabilität von GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> nach Behandlung mit Kälte, Hitze und Ultraschall. GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> wurde mittels EIA quantitativ bestimmt.

### 3.1.2 Wachstums- und Sekretionseigenschaften der GLUTag-Zelllinie

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung der Wachstums- und Sekretionseigenschaften der GLUTag-Zelllinie. Die gewonnenen Erkenntnisse dienen als Grundlage für weiterführende GLP-1 Sekretionsstudien (siehe Kapitel 3.4) und Untersuchungen zu muskarinergen Rezeptoren und Insulinrezeptoren (siehe Kapitel 3.5 - 3.8).

Die Wachstums- und Sekretionseigenschaften der drei Zellchargen GLUTag Chargen D94, D97 und R98 wurden über den Verlauf mehrerer Zellpassagen untersucht. Bei diesen Zellchargen handelt es sich um unterschiedliche Zellklone, die von Prof. Drucker (Universität Toronto) stammen. Da die genaue initiale Passagenzahl nicht von allen Zellchargen bekannt war, wurden die Passagen im Rahmen dieser Arbeit mit „x + aktuelle Passagenzahl“ bezeichnet. Nur von der GLUTag Charge D94 war die genaue Passagenzahl von 12 bekannt. Aus Gründen der Kontinuität wurden jedoch auch diese Passagen mit „x + aktuelle Passagenzahl“ bezeichnet.

Die Zellzahl von Kulturen der einzelnen Chargen wurde in definierten Zeitintervallen bestimmt und in Form von Wachstumskurven graphisch dargestellt. Zur Charakterisierung der GLP-1 Sekretionseigenschaften wurden das endogene Peptid GIP als Substanz mit oberflächenrezeptorvermitteltem Wirkmechanismus und der Phorbolster PDBU mit intrazellulärem Wirkmechanismus eingesetzt.

### **3.1.2.1 Wachstumseigenschaften unterschiedlicher GLUTag-Zellchargen**

#### ***Vergleich der GLUTag Chargen D94, D97 und R98***

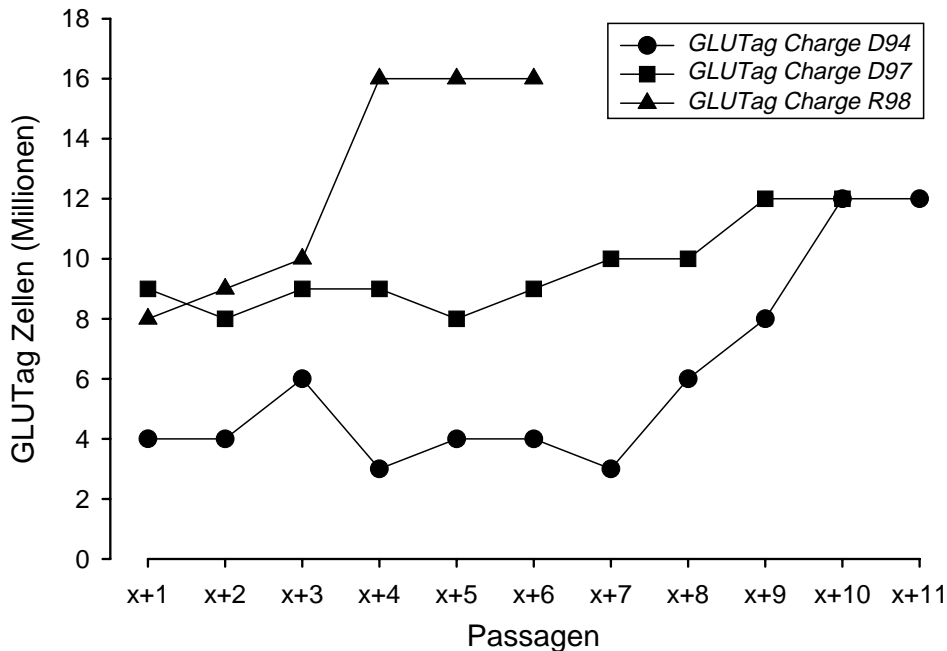
Das Wachstumsverhalten der GLUTag-Zelllinie wurde an den GLUTag Chargen D94, D97 und R98 untersucht. Dazu wurde die Zellzahl jeweils drei Tage nach dem Passagieren bestimmt und gegen die Anzahl der Passagen graphisch aufgetragen (Abb. 3-1).

Die Wachstumskurven ließen unterschiedliche Wachstumseigenschaften der einzelnen Zellchargen erkennen. GLUTag Charge D94 zeichnete sich durch konstantes Wachstum zwischen den Passagen x+1 und x+8 aus. Ab der Passage x+9 wurde ein Anstieg der Zellzahl beobachtet, der bei x+10 ein Plateau erreichte. Die Differenz zwischen der initialen Zellzahl und dem Plateauwert betrug acht Millionen Zellen. Ab der Passage x+11 neigten die Zellen zum Verklumpen und ließen sich beim Passagieren sehr schlecht vereinzeln.

GLUTag Charge D97 zeichnete sich durch konstantes Wachstum zwischen den Passagen x+1 und x+6 aus. Ab der Passage x+7 konnte ein langsamer Anstieg der Zellzahl beobachtet werden, der bei Passage x+9 ein Plateau erreichte. Die Differenz zwischen initialer Zellzahl und dem Plateauwert betrug drei Millionen Zellen. Die Zellen neigten von Beginn an zum Verklumpen und ließen sich beim Passagieren sehr schlecht vereinzeln.

GLUTag Charge R98 zeigte ab der Passage x+2 ein beschleunigtes Zellwachstum, das bereits bei x+4 ein Plateau erreichte. Die Differenz zwischen initialer Zellzahl und dem Plateauwert lag bei acht Millionen Zellen. Die Zellen neigten von Beginn an zum Verklumpen und ließen sich beim Passagieren sehr schlecht vereinzeln.

Es kann zusammengefaßt werden, daß die GLUTag Chargen D94 und D97 bei niedrigen Zellpassagen ein konstantes Zellwachstum aufwiesen. Dieses Wachstum stieg ab den Passagen  $x+7$  bzw.  $x+9$  graduell an und erreichte schließlich ein Plateau. Dagegen war die GLUTag Charge R98 von Beginn an durch eine stetige Zunahme der Zellzahl charakterisiert. Bei der Passage  $x+4$  wurde bereits ein Plateauwert erreicht.

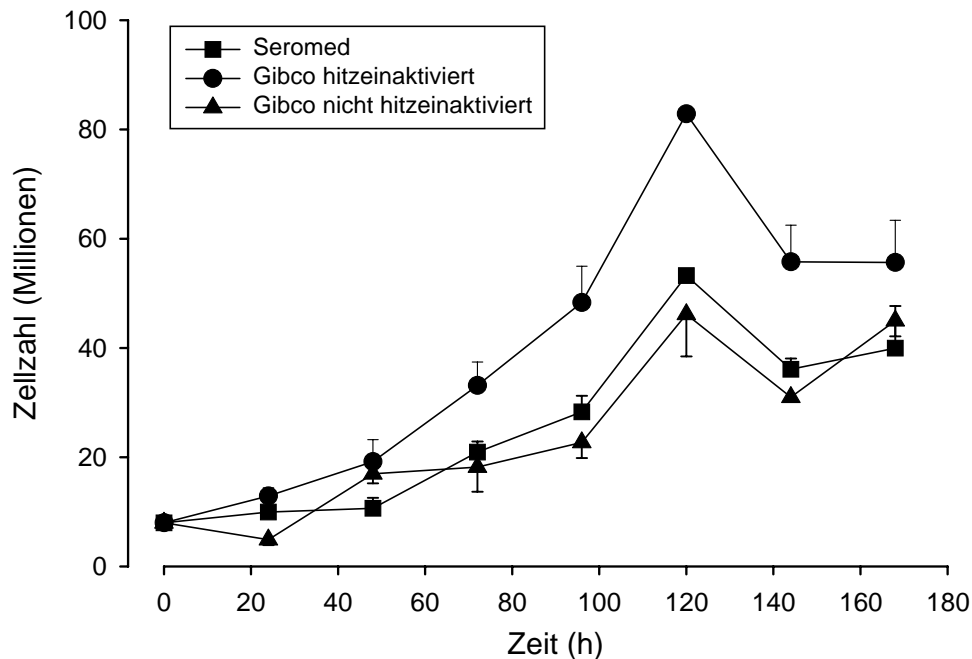


**Abb. 3-1:** Wachstumskurven der GLUTag Chargen D94, D97 und R98 über den Verlauf mehrerer Zellpassagen. Die Zellzahl wurde jeweils drei Tage nach dem Passagieren bestimmt. Als Medium wurde DMEM in Gegenwart von 10 % FCS und 4,5 g/l Glukose eingesetzt.

### ***Einfluß unterschiedlicher fötaler Rinderseren auf die GLUTag Charge D94***

An der GLUTag Charge D94 wurde exemplarisch der Einfluß unterschiedlicher fötaler Rinderseren auf das Zellwachstum untersucht. Dazu wurden jeweils ein hitzeinaktiviertes und ein nichthitzeinaktiviertes Serum der Firma GIBCO sowie ein nichthitzeinaktiviertes Serum der Firma Seromed getestet. Alle eingesetzten Seren waren von höchster Qualität bezogen auf den Endotoxingehalt.

Das Zellwachstum wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen beobachtet; die Bestimmung der Zellzahl erfolgte täglich. Abb. 3-2 zeigt die Wachstumskurven der GLUTag Charge D94 mit den drei unterschiedlichen fötalen Rinderseren. Die Kurven der beiden nicht-hitzeinaktivierten Seren sind fast identisch, während das hitzeinaktivierte Serum der Firma GIBCO zu einer steileren Wachstumskurve führte. Nach 120 Stunden lag die Zellzahl bei den



**Abb. 3-2:** Wachstumskurven der GLUTag Charge D94 in DMEM in Gegenwart von 10 % nicht-hitzeinaktiviertem (GIBCO, Seromed) und hitzeinaktiviertem (GIBCO) FCS. Die Zellzahl wurde alle 24 h über einen Zeitraum von sieben Tagen bestimmt.

nicht-hitzeinaktivierten Seren bei ungefähr 40 Millionen; bei dem hitzeinaktivierten Serum wurden nach diesem Zeitraum bereits über 80 Millionen Zellen gezählt.

Auch mittels Mikroskopie konnten unterschiedliche Effekte der einzelnen Seren auf die Zellen beobachtet werden. Der Einsatz nicht-hitzeinaktivierter Seren hatte ein Verklumpen der GLUTag-Zellen nach wenigen Passagen zur Folge. Außerdem schienen die Zellen im mikroskopischen Bild morphologisch schlechter erhalten zu sein. In den folgenden GLP-1 Sekretionsstudien wurden sowohl hitzeinaktiviertes als auch nicht-hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum der Firma GIBCO eingesetzt. Es sollte untersucht werden, ob unterschiedliches FCS die Sekretionseigenschaften beeinflusst.

### 3.1.2.2 Sekretionseigenschaften unterschiedlicher GLUTag-Zellchargen

Neben den Wachstumseigenschaften wurden die Sekretionseigenschaften der GLUTag Chargen D94, D97 und R98 untersucht. Dazu wurden zwei Substanzen eingesetzt: das endogene Peptid GIP mit oberflächenrezeptorvermittelter Wirkung und der Phorbol ester PDBU mit intrazellulärem Wirkmechanismus. Im Rahmen der Charakterisierung der GLP-1 Sekretionseigenschaften wurde der Verlauf der Sekretionsleistung über mehrere Passagen und der Einfluß der Ruhephasen, d.h der Zeit zwischen Zellaussaat und Stimulationsversuch,

untersucht. Außerdem wurden unterschiedliche Medien und Seren auf ihren Einfluß auf die GLP-1 Sekretion getestet. Die Ergebnisse der Sekretionsstudien wurden mit denen der Wachstumsstudien verglichen.

Die GLP-1 Stimulationsversuche wurden in 48-well Platten mit einer Zellzahl von 40.000 pro well über eine Inkubationszeit von zwei Stunden durchgeführt. Anschließend wurde das enteroendokrine Peptid mittels reverser Festphasenextraktion aus dem Überstand extrahiert und mit einem GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> EIA quantifiziert.

### **GLUtag Charge D94**

Die Sekretionseigenschaften der GLUtag Charge D94 sind in Tabelle 3-4 zusammengefaßt. Die GIP-induzierte GLP-1 Sekretion nahm mit steigender Passagenzahl ab. Zwischen den Passagen x+2 und x+7 zeichnete sich die GLUtag Charge D94 durch annähernd konstante Sekretionseigenschaften aus. Ab der Passage x+11 konnte keine Steigerung der GLP-1 Stimulation durch GIP (0,01 bis 0,3 µM) beobachtet werden. Parallel zur Abnahme der Sekretionsleistung war eine Zunahme des Zellwachstums zu beobachten (siehe auch Abb. 3-1). Die Ruhephasen der Zellen, d.h. die Zeit zwischen Zellaussaat und

Zellpassage	Stimulation mit GIP	Stimulation mit PDBU	Ruhephase der Zellen (h)	Zellzahl (Millionen/Flasche)
x + 2	+++	+++	48	4
x + 3	+	+++	24	6
x + 3	+++	+++	48	6
x + 4	+++	+++	48	3
x + 5	+++	+++	48	4
x + 6	++	+++	48	4
x + 7	++	+++	48	3
x + 7	+++	+++	60	3
x + 9	++	++	24	8
x + 9	++	++	48	8
x + 11	-	+	24	12

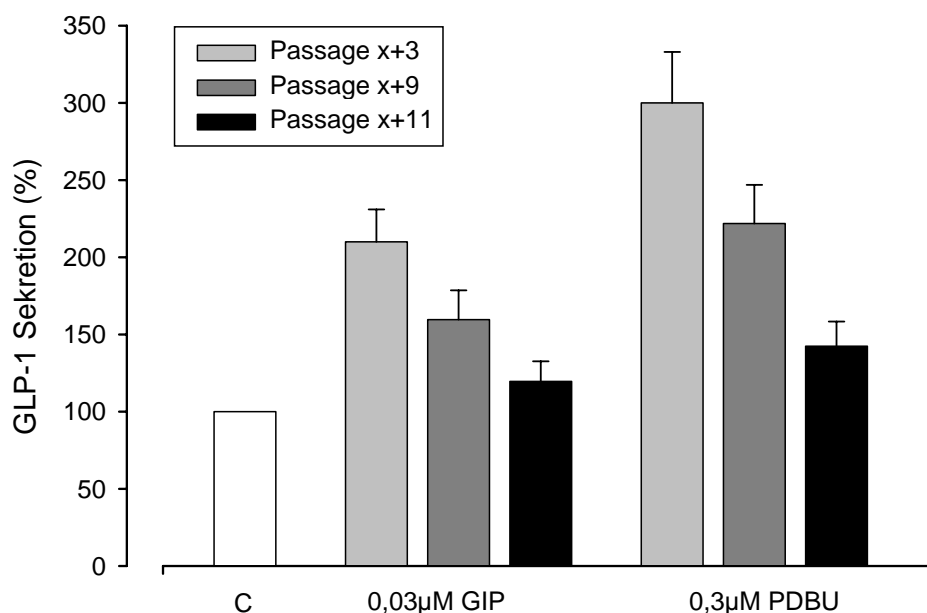
**Tabelle 3-4:** Zusammenfassung der GLP-1 Sekretionseigenschaften der Passagen x+2 bis x+11 der GLUtag Charge D94. Die Sekretionsversuche wurden mit 0,01 bis 0,3 µM GIP und 0,01 bis 1 µM PDBU über einen Inkubationszeitraum von 2 h durchgeführt. Parallel zur Abnahme der Sekretionsleistung mit zunehmender Passagenzahl ist ein Anstieg der Zellzahl zu beobachten. Die Symbole + bis +++ sind in Abb. 3-3 graphisch erläutert (Versuchsmedium: DMEM in Gegenwart von 0,5 % hitzeinaktiviertem FCS).



Stimulationsversuch, hatten keinen Einfluß auf die Sekretionseigenschaften. Es wurde jedoch immer eine Ruhephase von 24 h eingehalten, um die Regeneration potentiell geschädigter Oberflächenrezeptoren zu gewährleisten.

Der Phorbolster PDBU (0,01 bis 1  $\mu\text{M}$ ) wurde als Substanz mit intrazellulärem Wirkmechanismus eingesetzt. Tabelle 3-4 zeigt, daß der PKC-Aktivatoren zwischen den Passagen x+2 und x+7 zu einer konstanten Stimulation der GLP-1 Freisetzung führte. Ab der Passage x+9 war eine Abnahme der GLP-1 Sekretionsleistung zu beobachten. Die Ruhephasen hatten keinen Einfluß auf die PDBU-induzierte GLP-1 Freisetzung. Parallel zur Abnahme der Sekretionsleistung war eine Zunahme des Zellwachstums zu beobachten.

Während bei einer Passagenzahl von x+11 noch eine PDBU-induzierte Steigerung der GLP-1 Sekretion zu beobachten war, zeigte das Peptid GIP bei dieser Passage keine sekretionssteigernden Effekte mehr. Es bestand der Verdacht, daß Trypsin die Oberflächenrezeptoren schädigt, da der intrazellulär wirksame Phorbolster PDBU nach wie vor sekretionssteigernde Effekte aufwies. Alternativ wurden ECD light und ein enzymfreies Dissoziationsmedium getestet. Es zeigte sich jedoch, daß die Sekretionseigenschaften durch die Modifikationen nicht beeinflußt wurden. Die Zellen verloren nach wie vor ab der Passage



**Abb. 3-3:** GLP-1 Sekretionsversuche mit 0,1  $\mu\text{M}$  GIP und 0,1  $\mu\text{M}$  PDBU an der GLUTag Charge D94 mit den Passagen x+3, x+9 und x+11 über einen Zeitraum von 2 h. Dabei handelt es sich um repräsentative Einzelversuche, die der Erläuterung der Symbole + bis +++ aus Tabelle 3-1 dienen. Die GLP-1 Sekretion der Passage x+3 entspricht + + +, Passage x+9 entspricht + + und Passage x+11 entspricht +. Die Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf die GLP-1 Basalsekretion.

x+11 ihre GIP-Sensitivität. Die dargestellten Ergebnisse wurden mit DMEM in Gegenwart von hitzeinaktiviertem FCS erzielt. Die Sekretionsversuche wurden in DMEM und HBSS durchgeführt. Außerdem wurden hitzeinaktiviertes und nichthitzeinaktiviertes fötales Rinderserum getestet. Es zeigte sich, daß die unterschiedlichen Medien und Seren keinen Einfluß auf die Sekretionseigenschaften der GLUTag Charge D94 hatten (nicht gezeigt).

### ***GLUTag Charge D97***

Die GLUTag Charge D97 zeichnete sich durch konstantes Zellwachstum aus (Abb. 3-1). Die Inkubation mit dem duodenalen Peptid GIP in einem Konzentrationsbereich von 0,01 µM bis 0,3 µM führte zu keiner signifikanten Steigerung der GLP-1 Sekretion zwischen den Passagen x+3 und x+9 (Tabelle 3-5). PDBU (0,01 bis 1 µM) steigerte zwar die Peptidsekretion, allerdings war die Signalintensität geringer als bei der GLUTag Charge D94. Unterschiedliche Ruhephasen hatten keinen Einfluß auf die Sekretionsleistung; daher war diese Charge für GLP-1 Sekretionsstudien ungeeignet.

Zellpassage	Stimulation mit GIP	Stimulation mit PDBU	Ruhephase der Zellen (h)	Zellzahl (Millionen/Flasche)
x + 3	-	++	48	4
x + 3	-	++	24	6
x + 5	-	++	24	6
x + 5	-	+	48	3
x + 7	-	++	24	4
x + 7	-	++	48	4
x + 9	-	+	24	3
x + 9	-	+	48	3

**Tabelle 3-5:** Zusammenfassung der GLP-1 Sekretionseigenschaften der Passagen x+2 bis x+11 der GLUTag Charge D97. Die Sekretionsversuche wurden mit GIP (0,01 bis 0,3 µM) und PDBU (0,01 bis 1 µM) über einen Inkubationszeitraum von 2 h durchgeführt (Versuchsmedium: DMEM in Gegenwart von 0,5 % hitzeinaktiviertem FCS).

### ***GLUTag Charge R98***

Die GLUTag Charge R98 war ebenso wie die Charge D97 für GLP-1 Sekretionsstudien ungeeignet. GIP hatte in den getesteten Konzentrationen (0,01 bis 0,3 µM) keinen Einfluß auf

die Sekretion von GLP-1. PDBU (0,01 bis 1  $\mu\text{M}$ ) führte nur zu einer schwachen Steigerung der Sekretion (Tabelle 3-6). Daher wurden keine weiteren Untersuchungen an dieser Zellcharge durchgeführt.

Zellpassage	Stimulation mit GIP	Stimulation mit PDBU	Ruhephase der Zellen (h)	Zellzahl (Millionen/Flasche)
x + 3	-	+	24	10
x + 5	-	+	48	16
x + 7	-	+	24	16
x + 7	-	+	48	16

**Tabelle 3-6:** Zusammenfassung der GLP-1 Sekretionseigenschaften der Passagen x+2 bis x+11 der GLUTag Charge R98. Die Sekretionsversuche wurden mit GIP (0,01 bis 0,3  $\mu\text{M}$ ) und PDBU (0,01 bis 1  $\mu\text{M}$ ) über einen Inkubationszeitraum von 2 h durchgeführt (Versuchsmedium: DMEM in Gegenwart von 0,5% hitzeinaktiviertem FCS).

### **3.1.3 Kultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC)**

Neben der GLUTag-Zelllinie, die als L-Zellmodell diente, wurde eine Kultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC) etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden an FRIC-Kulturen Immunofluoreszenzmarkierungen und Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) durchgeführt. Bereits publizierte pharmakologische Daten wurden mit den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten GLP-1 Sekretionsstudien an der GLUTag-Zelllinie verglichen.

Das Originalprotokoll Brubakers zur Präparation fötaler Rattendarmzellen (FRIC) wurde modifiziert, um eine optimale Zellausbeute zu erhalten (Brubaker und Vranic, 1987). Vor der Präparation ist das exakte Alter der Föten zu beachten. Die Ontogenese des fötalen Rattendarms ist ein kritischer Faktor, da erst ab dem 19. Tag der fötalen Entwicklung die von Proglukagon abgeleiteten Peptide, darunter auch GLP-1, in detektierbaren Mengen im Darm exprimiert werden (Brubaker, 1987). Dies erforderte die enge Zusammenarbeit mit der Tierzucht. Der Zeitpunkt der Verpaarung wurde auf 12 Stunden eingrenzt; somit konnte der Verlauf der fötalen Entwicklung zeitlich exakt verfolgt werden.

Im Rahmen der Präparation wurden drei Parameter als entscheidend identifiziert: die eingesetzten Enzyme, das fötale Rinderserum und zwei zusätzliche Waschschrte. Die eingesetzte Menge an Kollagenase wurde individuell für eine Charge optimiert. Viele der

getesteten Chargen erwiesen sich als ungeeignet, da die Zellanheftung negativ beeinflusst wurde. Um konstante Versuchsbedingungen zu schaffen, wurde ein Vorrat der entsprechenden Chargen angelegt. Außerdem konnte FCS als entscheidender Faktor für eine optimale Zelladhäsion identifiziert werden. Auch hier wurden entsprechende FCS-Chargen identifiziert und auf Vorrat gelegt.

Das Versuchsprotokoll wurde durch das Einfügen mehrerer Waschschrte zu Beginn und gegen Ende der Präparation optimiert. Diese Waschschrte führten zu einer deutlich verbesserten Zellanheftung. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der Reduktion der Erythrozytenzahl durch das mehrmalige Waschen: Erythrozyten wirken zytotoxisch und können somit die Zelladhäsion negativ beeinflussen. Diese Hypothese wurde experimentell nicht überprüft.

### **3.2 GLP-1 FLUORESZENZMARKIERUNGEN UND KONFOKALE LASER-SCANNING MIKROSKOPIE (CLSM) AN DER GLUTAG-ZELLINIE**

Das Vorkommen und die Verteilung des enteroendokrinen Peptids GLP-1 in GLUTag-Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Zellen mit GLP-1-Antiserum und einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper inkubiert. Zur Untersuchung der dreidimensionalen intrazellulären Verteilung von GLP-1 Sekretgranula wurden immunopositive Zellen mittels CLSM gescant. Die so gewonnenen Bildstapel wurden mit Hilfe eines Computers dreidimensional rekonstruiert.

#### **3.2.1 GLP-1 Fluoreszenzmarkierungen**

Die mit 4 %igem Formalin fixierten und anschließend permeabilisierten GLUTag-Zellen wurden mit Kaninchen-GLP-1 (7-37)-Antiserum und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert. Die Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 3-4 A und 3-4 C zeigen, daß alle Zellen GLP-1 immunopositiv sind. Die Fluoreszenzintensitäten variieren jedoch zwischen den Zellen eines Präparats.

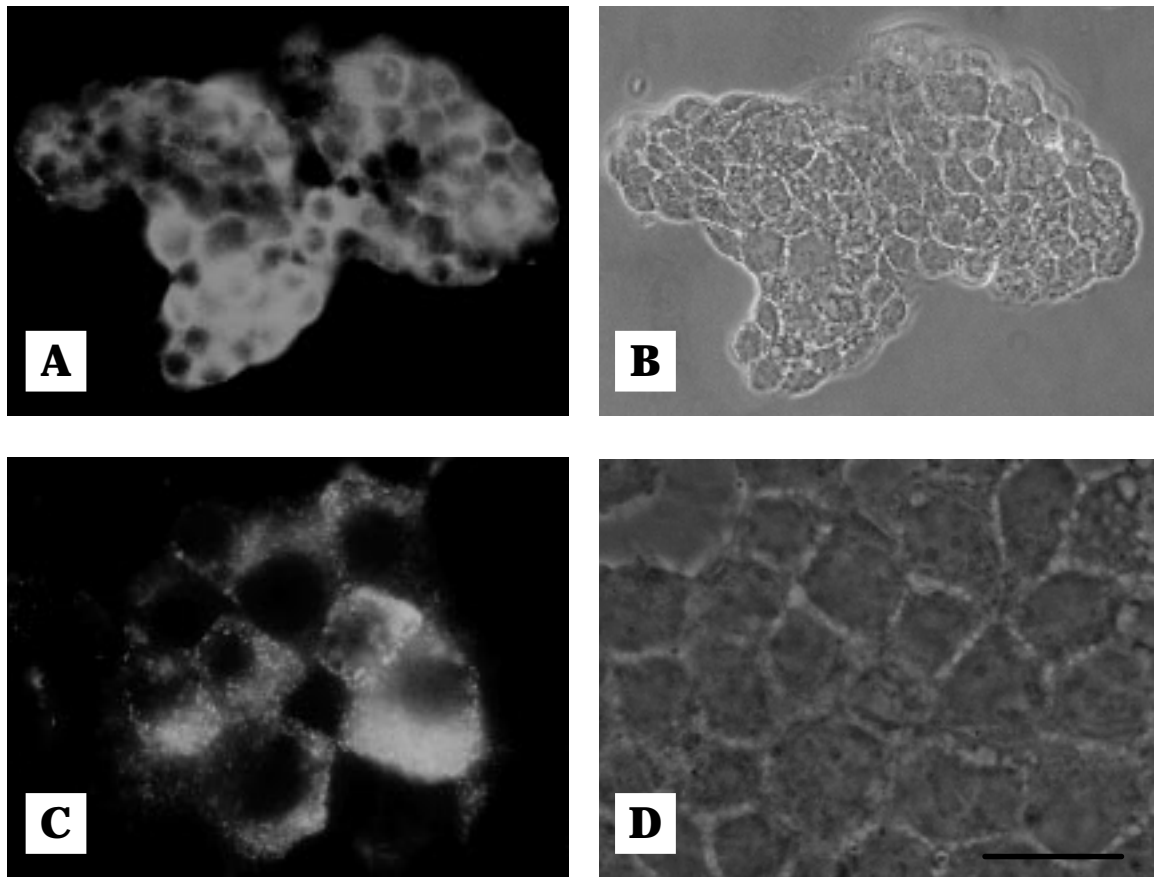
In Abb. 3-4 C ist die granuläre Lokalisation von GLP-1 im Zytoplasma der Zellen zu erkennen. Die Sekretgranula erscheinen innerhalb der Zellen nicht polarisiert, sondern diffus im Zytoplasma verteilt vorzuliegen. Um diese Beobachtung zu überprüfen, wurden fluoreszenzmarkierte GLUTag-Zellen mittels CLSM untersucht (siehe 3.2.2).

Die am äußeren Rand des Präparats lokalisierten GLUTag-Zellen in Abb. 3-4 C sind nicht GLP-1 immunopositiv. Dieses Phänomen ist entweder durch unzureichende Fixation bzw. Permeabilisierung der Zellen und dadurch mangelnde Penetration der Antikörper zu erklären. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen die gute Strukturhaltung der Zellen nach Formalinfixation (Abb. 3-4 B und D).

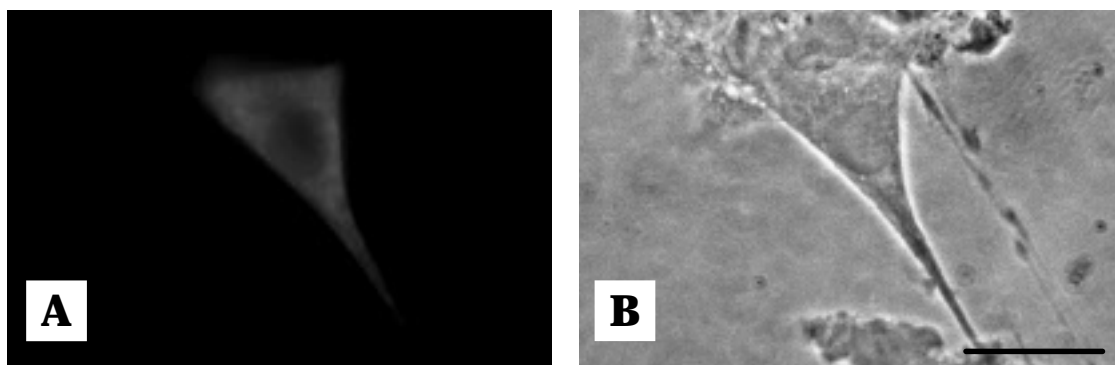
Kontrollmarkierungen mit Kaninchen-Normalserum führten zu sehr schwacher unspezifischer Hintergrundfluoreszenz (nicht gezeigt), die die Spezifität der GLP-1 Markierung bestätigt.

#### **3.2.2 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM)**

Die dreidimensionale Verteilung von GLP-1 Granula innerhalb von GLUTag-Zellen wurde mittels CLSM untersucht. Diese Methode ermöglicht es, Proben optisch zu schneiden, indem man schrittweise in die Tiefe (z-Scan) der Objekte hineinscant. Der gewonnene Bildstapel wurde anschließend im Computer zu einer dreidimensionalen Darstellung rekonstruiert. Abb. 3-7 zeigt einen Verband von fünf GLP-1 immunopositiven GLUTag-Zellen in vier verschiedenen Schnittebenen.

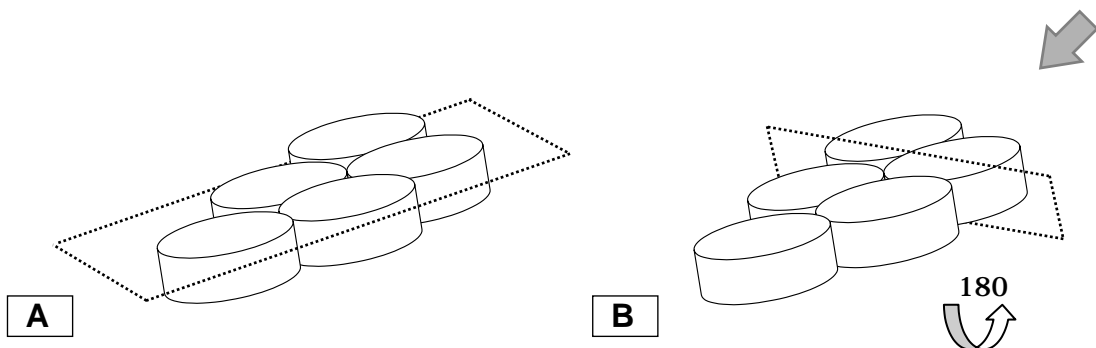


**Abb. 3-4:** Lokalisation von GLP-1 in Granula von GLUTag-Zellen. Die Zellen wurden mit 4% igem Formalin fixiert und mit Kaninchen-anti-GLP-1 (7-37)-Antiserum und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert. A, C: GLP-1 (7-37)-Antiserum. B, D: Phasenkontrast. Balken = 5  $\mu$ m.



**Abb. 3-5:** Lokalisation von GLP-1 in Granula einer L-Zelle in einer Kultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC). Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit Kaninchen-anti-GLP-1 (7-37)-Antiserum und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper. Die Zellen wurden zuvor mit 4 % igem Formalin fixiert. A: GLP-1 (7-37)-Antiserum. B: Phasenkontrast Balken = 5  $\mu$ m.

Die oberste Aufnahme stellt den vollständig rekonstituierten Zellverband dar, d.h. es wurden alle Bildstapel zu einer dreidimensionalen Darstellung zusammengesetzt. Die darunter folgenden Aufnahmen ermöglichen den Blick in die Zellen in drei verschiedenen Schnittebenen. Die im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung gemachten Beobachtungen, daß alle GLUTag-Zellen GLP-1 immunopositiv sind und die Fluoreszenzintensitäten zwischen den Zellen variieren, konnten mittels der CLSM bestätigt werden. Außerdem ist in Abb. 3-7 keine Polarisierung der Granula zu erkennen. Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, wurde ein x/z Schnitt durch den Zellverband gelegt. Wie Abb. 3-8 zeigt, ist auch in dieser Perspektive keine Polarisierung der GLP-1 Granula innerhalb der Zellen zu erkennen.



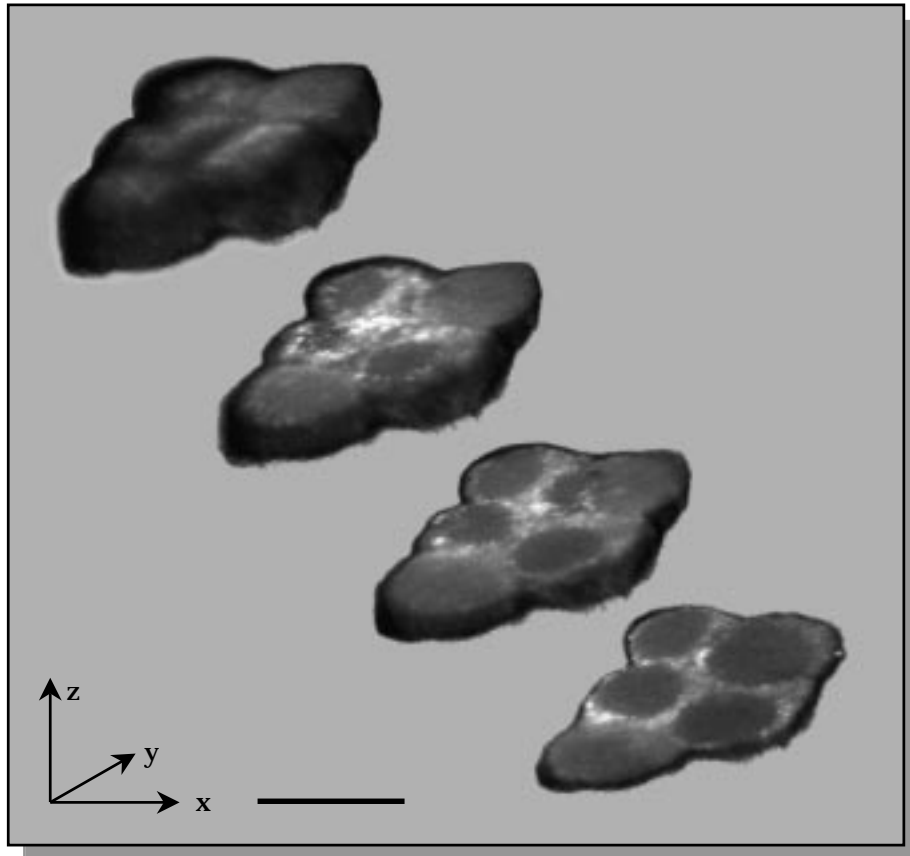
**Abb. 3-6:** Schematische Darstellung der Schnittebenen der an GLUTag-Zellen durchgeführten und in den Abb. 3-7 und 3-8 gezeigten CLSM.

### 3.3 GLP-1 FLUORESCENZMARKIERUNGEN UND KONFOKALE LASER-SCANNING MIKROSKOPIE (CLSM) AN FÖTALEN RATTENDARMZELLEN

Analog zu den Fluoreszenzmarkierungen an der GLUTag-Zelllinie wurden fötale Rattendarmzellen (FRIC) auf GLP-1 immunopositive Zellen untersucht. Da es sich bei den FRIC-Kulturen um eine heterogene Zellpopulation handelt, war es von Interesse, den Anteil an L-Zellen an der Gesamtzellpopulation zu bestimmen. Dazu wurden die Zellen mit GLP-1-Antiserum und einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper inkubiert. Zur Untersuchung der dreidimensionalen Verteilung von GLP-1 Granula in L-Zellen wurde die CLSM eingesetzt.

#### 3.3.1 GLP-1 Fluoreszenzmarkierungen

Die mit 4 %igem Formalin fixierten und anschließend permeabilisierten FRIC-Kulturen wurden mit Kaninchen-anti-GLP-1 (7-37)-Antiserum und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert.



**Abb. 3-7:** Dreidimensionale Darstellung der Verteilung von GLP-1 Granula in GLUTag-Zellen. Formalin-fixierte Zellen wurden sukzessive mit Kaninchen-anti-GLP-1-Antiserum und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert. Die Abbildung erfolgte via CLSM. Zur Erläuterung der Schnittebenen siehe Abb. 3-6 A. Balken = 5  $\mu$ M.



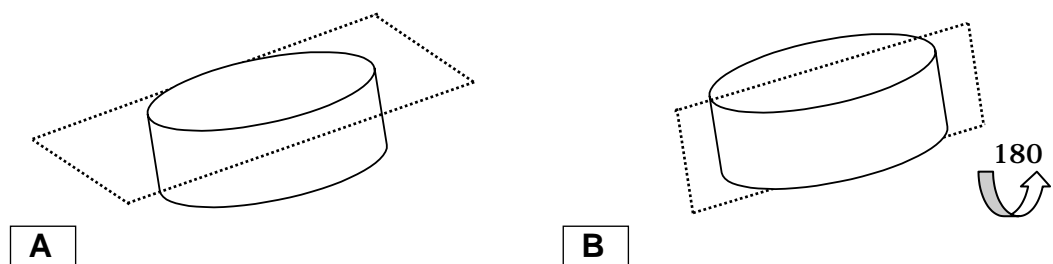
**Abb. 3-8:** Dreidimensionale Darstellung der Verteilung von GLP-1 Granula in GLUTag-Zellen. Durch den in Abb. 3-7 dargestellten Zellverband wurde ein x/z-Schnitt gelegt. Zur Erläuterung der Schnittenbene siehe Abb. 3-6 B. Balken = 5  $\mu$ m.



In Abb. 3-10 A sind zwei GLP-1 immunopositive Zellen zu erkennen, die am Rande eines großen Zellverbandes lokalisiert sind. In einem vergrößerten Bildausschnitt ist die Lokalisation von GLP-1 in Granula zu beobachten (Abb. 3-10 C) - die Sekretgranula liegen in beiden L-Zellen polarisiert vor.

Die Fluoreszenzaufnahmen verdeutlichen den geringen Anteil von L-Zellen an der Gesamtzellpopulation. Da die GLP-1 immunopositiven Zellen am Rand des Zellverbandes liegen, besteht die Möglichkeit, daß die Antikörper nicht vollständig in den Verband penetrieren konnten. In Abb. 3-10 A sind weitere vier bis fünf sehr schwach GLP-1 immunopositive Zellen zu erkennen. Inklusive dieser Zellen liegt der prozentuale Anteil der L-Zellen an der Gesamtzellzahl unter einem Prozent. Die Phasenkontrastaufnahmen demonstrieren die gute Strukturhaltung der Zellen nach Formalinfixation (Abb. 3-10 B und Abb. 3-10 D).

Die dreieckige L-Zelle in Abb. 3-5 A läßt die granuläre Lokalisation von GLP-1 im Zytoplasma erkennen: die Granula scheinen in dieser Zelle nicht polarisiert vorzuliegen. Im Gegensatz zu den beiden anderen L-Zellen in Aufnahme 3-10 A, die in einem Zellverband lokalisiert sind, handelt es sich hier um eine vereinzeltete Zelle.



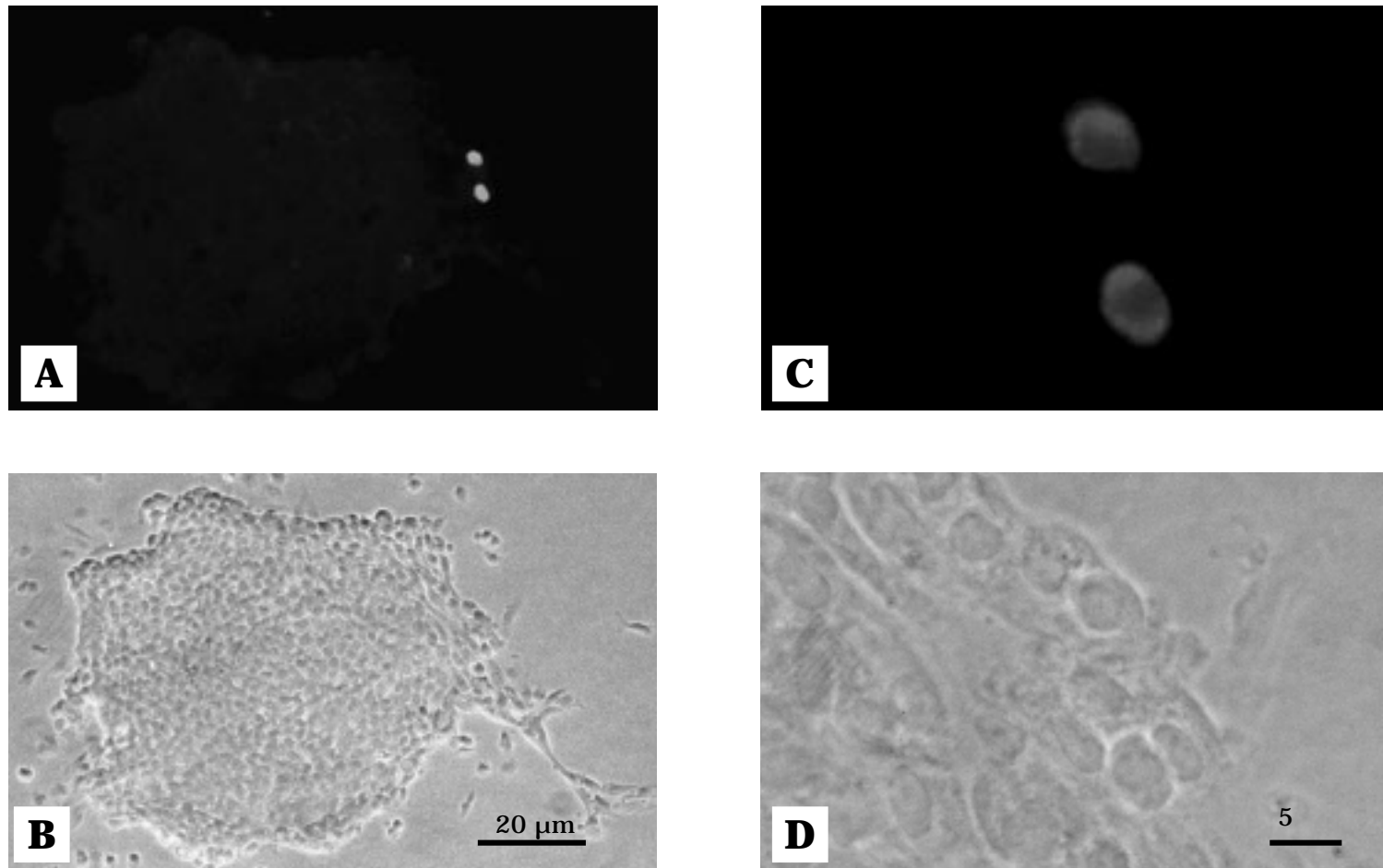
**Abb. 3-9:** Schematische Darstellung der Schnittebenen der an einer L-Zelle einer Kultur fötaler Rattendarmzellen durchgeführten und in den Abb. 3-11 und 3-12 gezeigten CLSM.

### **3.3.2 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM)**

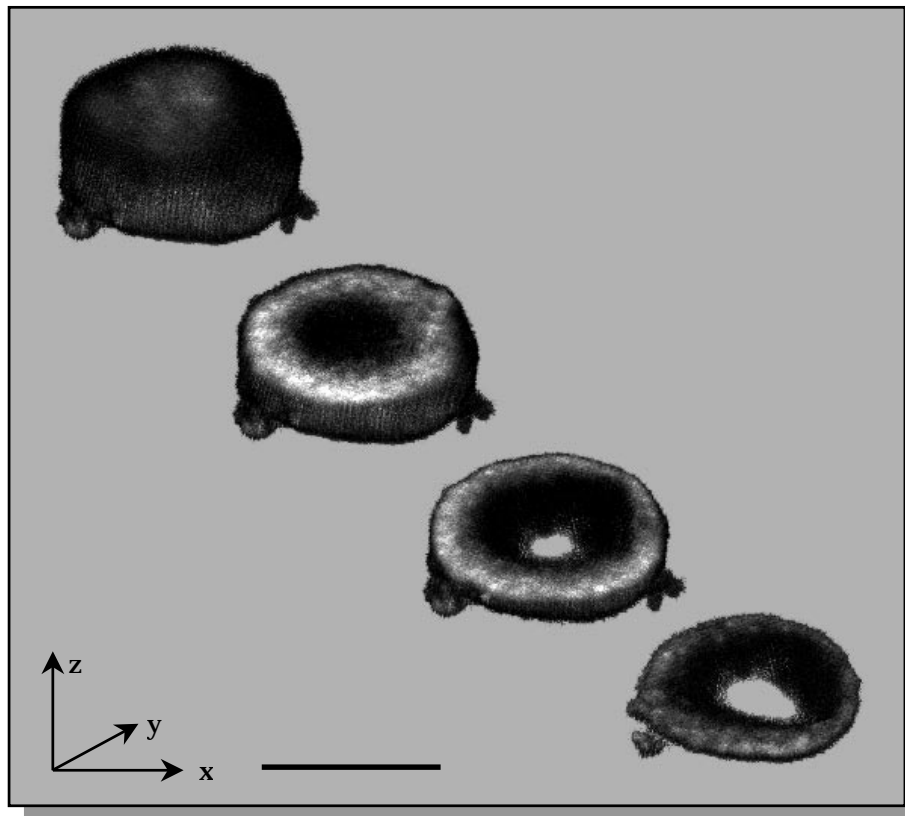
Die im Rahmen der Fluoreszenzmarkierungen beobachtete Polarisierung der GLP-1 Granula wurde mittels der CLSM genauer untersucht.

Abb. 3-11 zeigt eine GLP-1 immunopositive Zelle in vier Schnittebenen. Die oberste Aufnahme stellt die vollständig rekonstituierte Zelle dar. In den folgenden drei Aufnahmen ist eine Polarisierung der Granula innerhalb der L-Zelle zu beobachten. Die Fluoreszenzintensität nimmt von oben nach unten ab.

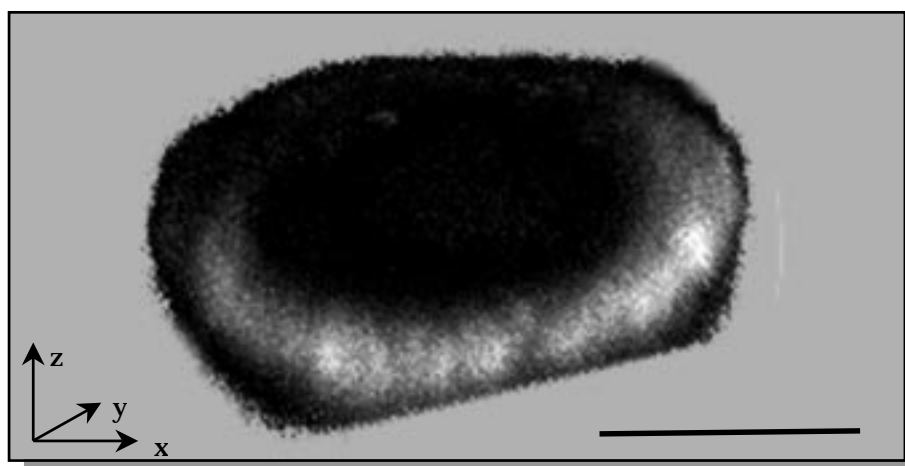
Ein x/z-Schnitt durch die Zelle bestätigte diese Beobachtungen (Abb. 3-12). Für diese Darstellung wurde die L-Zelle um 180° gedreht, so daß sich die Granula in dieser Perspektive unten befinden.



**Abb. 3-10:** Lokalisation von GLP-1 in Granula von L-Zellen einer Kultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC). Die Fluoreszenzmarkierungen erfolgten mit Kaninchen-anti-GLP-1 (7-37)-Antiserum und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper. Die Zellen wurden zuvor mit 4 %igem Formalin fixiert. A, C: GLP-1 (7-37)-Antiserum. B, D: Phasenkontrast.



**Abb. 3-11:** Dreidimensionale Darstellung der Verteilung von GLP-1 Granula in einer L-Zelle einer Kultur fötaler Rattendarmzellen. Formalin-fixierte Zellen wurden sukzessive mit Kaninchen-anti-GLP-1-Antiserum und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert. Die Abbildung erfolgte via CLSM. Zur Erläuterung der Schnittebenen siehe Abb. 3-9 A. Balken = 5  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 3-12:** Dreidimensionale Darstellung der Verteilung von GLP-1 Granula in einer L-Zelle einer Kultur fötaler Rattendarmzellen. Durch die in Abb. 3-11 dargestellte Zelle wurde ein x/z-Schnitt gelegt. Zur Erläuterung der Schnittebene siehe Abb. 3-9 B. Balken = 2,5  $\mu\text{m}$ .

### **3.4 GLP-1 SEKRETIONSSTUDIEN AN DER GLUTAG-ZELLINIE**

Basierend auf den Ergebnissen der methodischen Evaluierung wurden an der GLUTag-Zelllinie GLP-1 Sekretionsstudien zur Untersuchung vorhandener Signaltransduktionswege durchgeführt. Die Charakterisierung der Wachstums- und Sekretionseigenschaften zeigte, daß nur Zellen der GLUTag Charge D94 in Passagen bis x+7 für Sekretionsstudien geeignet waren (siehe 3.1.1). In höheren Passagen wurde vermehrtes Zellwachstum und abnehmendes Sekretionsvermögen beobachtet. In den folgenden Untersuchungen wurden daher Zellen der GLUTag Charge D94 in Passagen bis maximal x+7 eingesetzt.

Die zu untersuchenden Substanzen zur Stimulation der GLP-1 Sekretion wurden nach ihrem Wirkmechanismus in zwei Gruppen unterteilt: Substanzen mit intrazellulärem und Substanzen mit oberflächenrezeptorvermitteltem Wirkmechanismus.

Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden mit der zu untersuchenden Substanz wurde GLP-1 aus dem Überstand mittels reverser Festphasenextraktion extrahiert. Dazu wurden OASIS-Säulen der Firma Waters eingesetzt, deren GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> Wiederfindungsrate mit 76 % bestimmt wurde (siehe 3.1.1.1). Die anschließende Quantifizierung des Peptids erfolgte enzymatisch mit einem kommerziell erhältlichen GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> EIA.

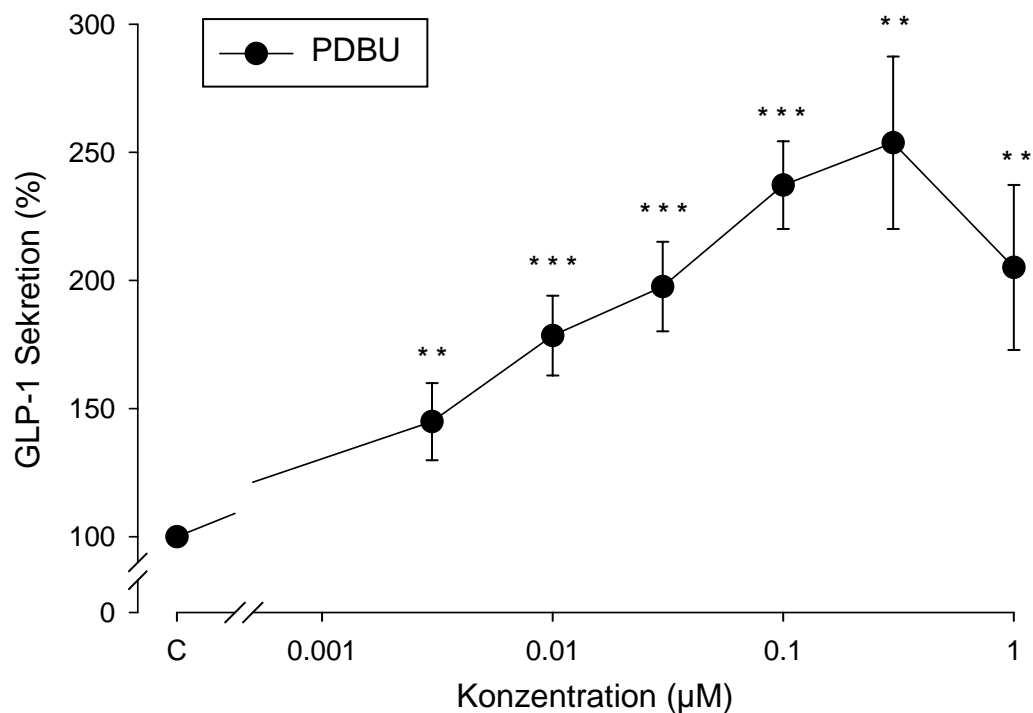
#### **3.4.1 Substanzen mit intrazellulärem Wirkmechanismus**

Der PKC-Aktivator Phorbol-12,13-dibutyrat (PDBU), der Adenylatcyklase-Aktivator Forskolin, der unspezifische Phosphodiesterase-Inhibitor 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) und Forskolin in Kombination mit IBMX wurden als Substanzen mit intrazellulärem Wirkmechanismus zur Stimulation der GLP-1 Sekretion untersucht.

##### **3.4.1.1 Phorbol-12,13-dibutyrat (PDBU)**

Der kokarzinogen-wirkende Phorbol-12,13-dibutyratester PDBU ist ein potenter Aktivator der PKC. Er wurde zur Stimulation der GLP-1 Sekretion in Konzentrationen von 0,003 bis 1 µM eingesetzt. Die Sekretionsstudien wurden in DMEM in Gegenwart von 0,5 % FCS und 1 g/l oder 4,5 g/l Glukose über einen Zeitraum von zwei Stunden durchgeführt.

Alle eingesetzten Konzentrationen führten zu einer signifikanten Steigerung der GLP-1 Sekretion bezogen auf die Basalsekretion (Abb. 3-13). Es konnte kein Unterschied in der Sekretionsleistung in der Gegenwart von 1 g/l oder 4,5 g/l Glukose festgestellt werden (nicht gezeigt). Bereits 0,003 µM PDBU führten zu einer Steigerung auf  $144,9 \pm 15,1$  % ( $P < 0,001$ ). Eine maximale Steigerung auf  $253,7 \pm 33,7$  % ( $P < 0,01$ ) wurde bei einer Konzentration von



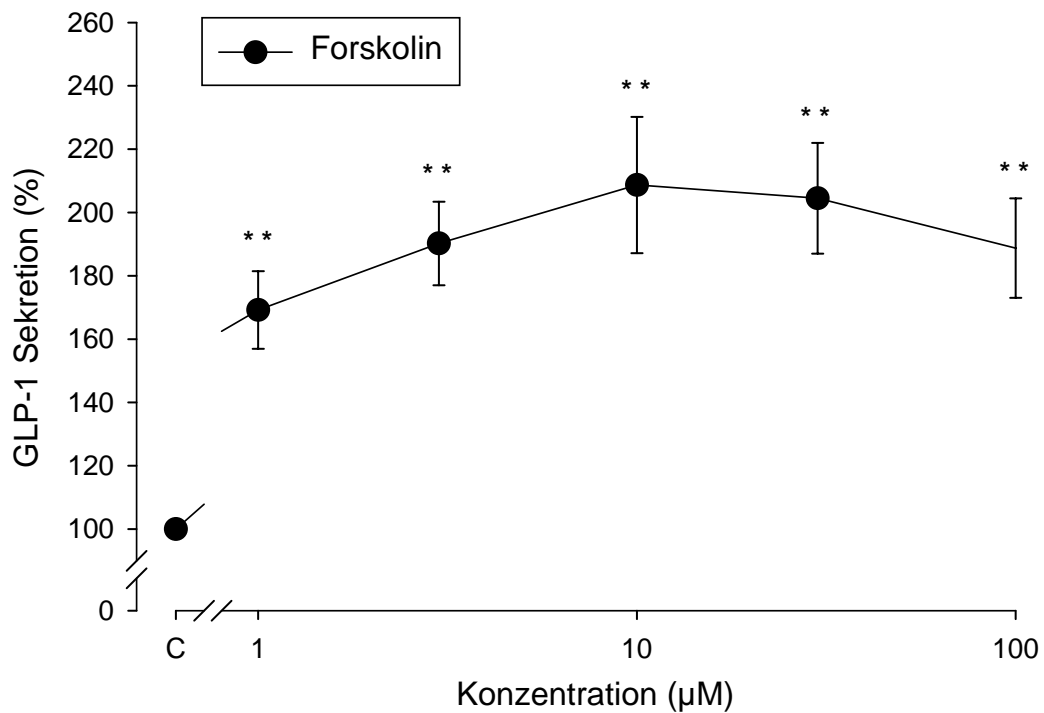
**Abb. 3-13:** Einfluß von Phorbol-12,13-dibutyrate (PDBU) in unterschiedlichen Konzentrationen auf die GLP-1 Sekretion an GLUTag-Zellen. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 2 h in DMEM mit 0,5 % FCS. Anschließend wurde GLP-1 aus dem Überstand mittels reverser Festphasenextraktion extrahiert und quantitativ bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert (0 μM PDBU). Werte als Mittelwert ± SEM. n = 5.

0,3 μM beobachtet. 1 μM PDBU ergaben einen Anstieg der Sekretion auf  $205,1 \pm 32,2$  % ( $P < 0,01$ ).

#### 3.4.1.2 Forskolin

Der Adenylatcyklase-Aktivator Forskolin gehört strukturell zu der Gruppe der Labdan-Diterpene und wird aus den Wurzeln der indischen Pflanze *Coleus forskoli* gewonnen.

Zur Stimulation der GLP-1 Sekretion wurde Forskolin in Konzentrationen von 1 bis 100 μM untersucht. Alle eingesetzten Konzentrationen führten zu einer signifikanten Steigerung der Peptidsekretion (Abb. 3-14). 1 μM Forskolin steigerte die Sekretion auf  $169,2 \pm 12,3$  % ( $P < 0,01$ ). Ein Sekretionsmaximum von  $208,7 \pm 21,5$  % ( $P < 0,01$ ) wurde bei einer Konzentration von 10 μM erreicht. Die höchste eingesetzte Konzentration von 100 μM Forskolin führte zu einer Steigerung der GLP-1 Sekretion auf  $188,8 \pm 15,7$  % ( $P < 0,01$ ). Alle angegebenen Werte sind auf die GLP-1 Basalsekretion bezogen.



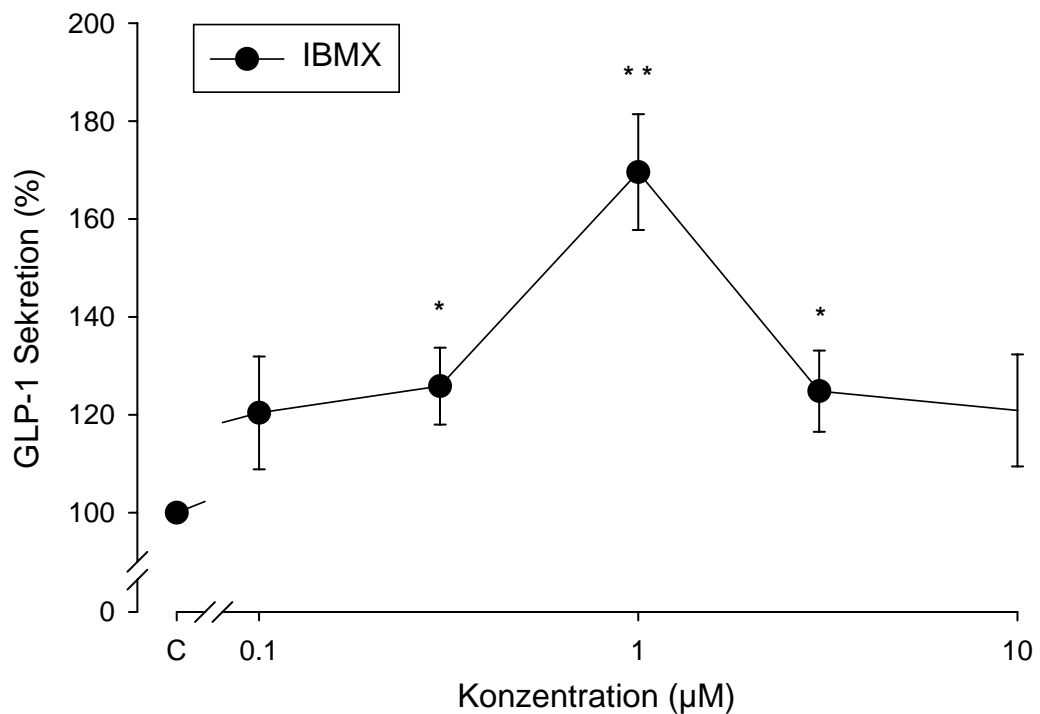
**Abb. 3-14:** Einfluß von Forskolin in unterschiedlichen Konzentrationen auf die GLP-1 Sekretion an GLUTag-Zellen. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 2 h in DMEM mit 0,5 % FCS. Anschließend wurde GLP-1 aus dem Überstand mittels reverser Festphasenextraktion extrahiert und quantitativ bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert (0 µM Forskolin). Werte als Mittelwert  $\pm$  SEM. n = 4.

### 3.4.1.3 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)

Der unspezifische Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 100 µM untersucht. Konzentrationen zwischen 3 und 30 µM führten zu einer signifikanten Steigerung der GLP-1 Sekretion (Abb. 3-15). 3 und 30 µM IBMX steigerten die Sekretion auf  $125,9 \pm 7,8$  % ( $P < 0,05$ ) und  $124,8 \pm 8,3$  % ( $P < 0,05$ ) bezogen auf die Basalsekretion. Das Sekretionsmaximum von  $169,6 \pm 1,8$  % ( $P < 0,01$ ) wurde bei einer Konzentration von 10 µM erreicht.

### 3.4.1.4 Forskolin/IBMX

Forskolin und IBMX wurden gemeinsam in einer Konzentration von jeweils 10 µM eingesetzt. Es sollten potentielle synergistische Effekte der Substanzkombination auf die GLP-1 Sekretion untersucht werden. Die gleichzeitige Inkubation mit Forskolin und IBMX führte zu einer Steigerung der GLP-1 Sekretion auf  $409,1 \pm 43,4$  % ( $P < 0,001$ ) bezogen auf die Basalsekretion (Abb. 3-16). In den vorherigen Versuchen wurde bei einer Konzentration von

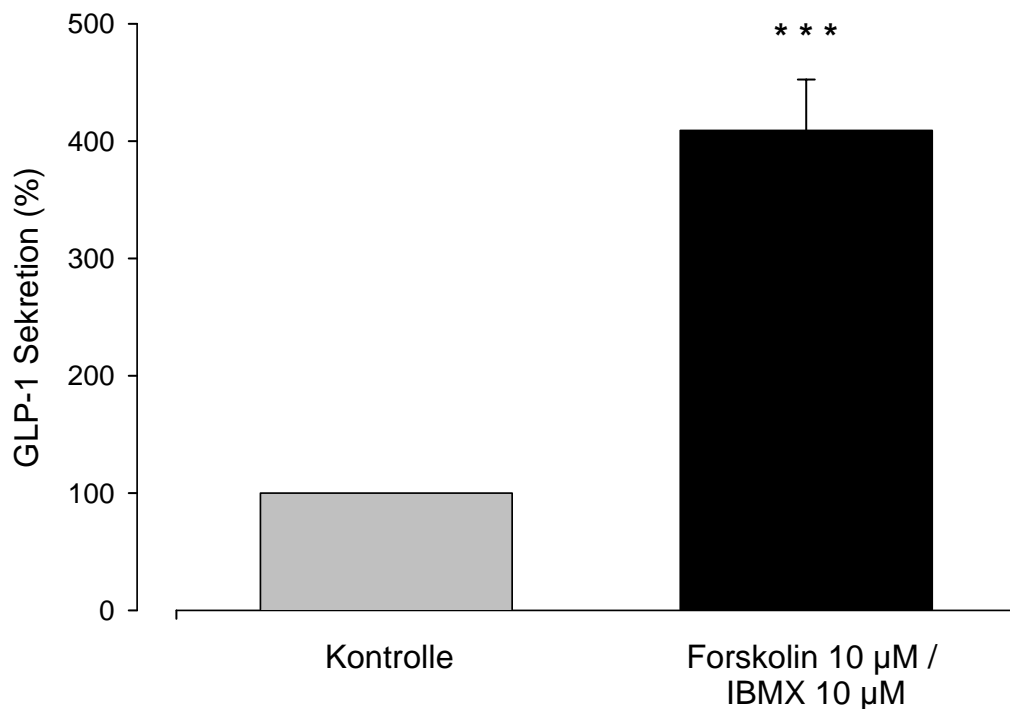


**Abb. 3-15:** Einfluß von 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) in unterschiedlichen Konzentrationen auf die GLP-1 Sekretion an GLUTag-Zellen. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 2 h in DMEM mit 0,5 % FCS. Anschließend wurde GLP-1 aus dem Überstand mittels reverser Festphasenextraktion extrahiert und quantitativ bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert (0 µM IBMX). Werte als Mittelwert  $\pm$  SEM. n = 4.

10 µM des Adenylatcyclase-Aktivators ein Anstieg der Sekretionsleistung auf  $208,7 \pm 21,5$  % ( $P < 0,01$ ) und bei 10 µM des Phosphodiesterase-Inhibitors auf  $169,6 \pm 11,8$  % ( $P < 0,01$ ) beobachtet. Bei der Kombination der beiden Substanzen liegt demnach eine additive synergistische Wirkung auf die GLP-1 Sekretion vor.

### **3.4.2 Substanzen mit oberflächenrezeptorvermitteltem Wirkmechanismus**

Für die folgenden GLP-1 Sekretionsstudien an der GLUTag-Zelllinie wurden das endogene Peptid GIP und das Neuropeptid Bombesin als Substanzen mit oberflächenrezeptorvermitteltem Wirkmechanismus eingesetzt. Außerdem wurden die muskarinergen Agonisten Bethanechol und Oxotremorinsesquifumarat untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien sind im Kapitel 3.5 beschrieben.



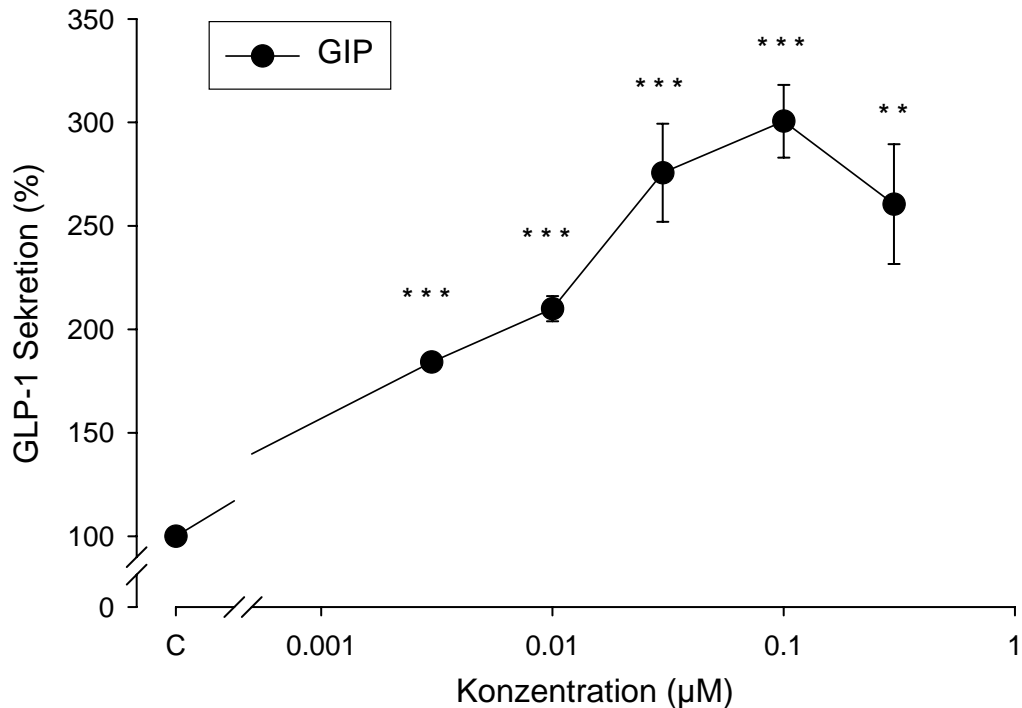
**Abb. 3-16:** Einfluß einer Kombination von 10 µM Forskolin und 10 µM IBMX auf die GLP-1 Sekretion an GLUTag-Zellen. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 2 h in DMEM mit 0,5 % FCS. Anschließend wurde GLP-1 aus dem Überstand mittels reverser Festphasenextraktion extrahiert und quantitativ bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert (0 µM Forskolin/0 µM IBMX). Werte als Mittelwert  $\pm$  SEM. n = 4.

### 3.4.2.1 Glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP)

Das duodenale Peptid GIP stimuliert in Ratten die GLP-1 Freisetzung (Roberge und Brubaker, 1993; Huang und Brubaker, 1995). Außerdem ist das Peptid ein potenter Stimulator der Insulinsekretion aus dem Pankreas (Jia et al., 1995). GIP wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,003 bis 1 µM eingesetzt. Alle getesteten Konzentrationen führten zu einer signifikanten Steigerung der GLP-1 Sekretion bezogen auf die Basalsekretion (Abb. 3-17). Bereits bei 0,003 µM GIP wurde ein Anstieg auf  $184,2 \pm 2,1$  % ( $P < 0,001$ ) beobachtet. Das Sekretionsmaximum von  $300,6 \pm 17,6$  % ( $P < 0,001$ ) wurde bei 0,1 µM erreicht. Bei der höchsten untersuchten Konzentration von 1 µM stieg die Sekretionsleistung auf  $260,5 \pm 29,0$  % ( $P < 0,01$ ).

Die Sekretionsstudien wurden in DMEM in Gegenwart von 0,5 % FCS und 1,0 g/l oder 4,5 g/l Glukose über einen Zeitraum von 2 h durchgeführt. Es wurden keine Unterschiede in der GLP-1 Sekretionsleistung bei den unterschiedlichen Glukosekonzentrationen beobachtet (nicht gezeigt).

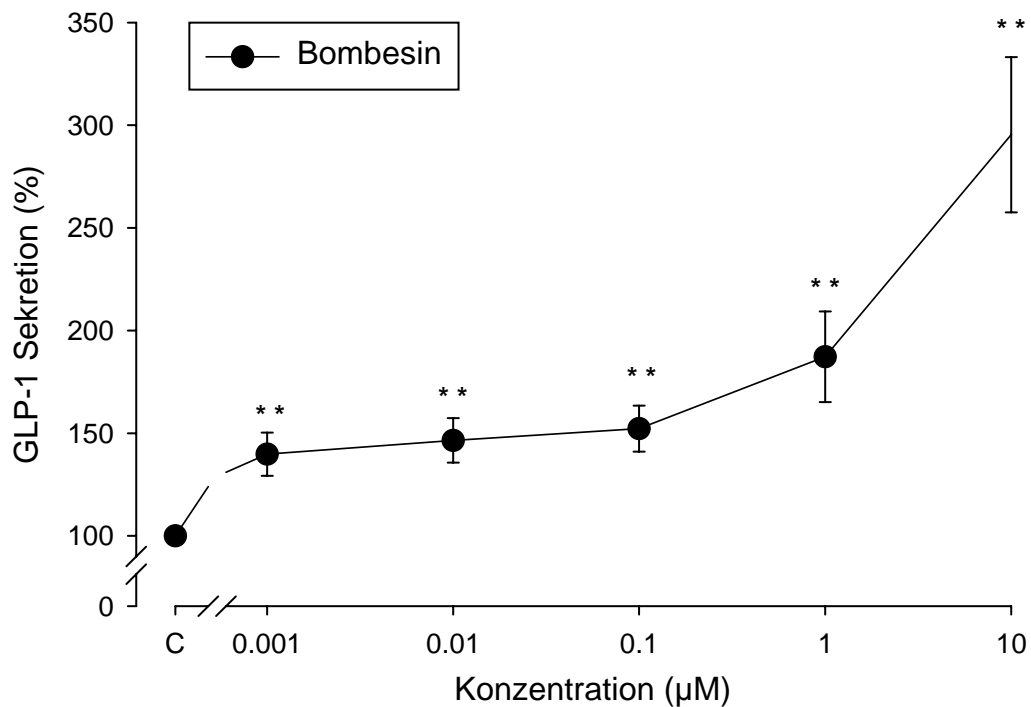




**Abb. 3-17:** Einfluß von glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) in unterschiedlichen Konzentrationen auf die GLP-1 Sekretion an GLUTag-Zellen. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 2 h in DMEM mit 0,5 % FCS. Anschließend wurde GLP-1 aus dem Überstand mittels reverser Festphasenextraktion extrahiert und quantitativ bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert (0 µM GIP). Werte als Mittelwert  $\pm$  SEM. n = 5.

### 3.4.2.2 Bombesin

Das GRP-Analogon Bombesin ist ein Neuropeptid, das ursprünglich aus der Haut der Amphibien *Bombina bombina* bzw. *Bombina variegata variegata* gewonnen wurde. Bombesin wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,001 bis 10 µM auf GLP-1 sekretionssteigernde Eigenschaften untersucht. Bei allen eingesetzten Konzentrationen konnte eine signifikante Steigerung der GLP-1 Sekretion bezogen auf die Basalsekretion beobachtet werden (Abb. 3-18). 0,001 µM Bombesin erhöhten die Sekretion auf  $139,8 \pm 10,5$  % ( $P < 0,01$ ). Die höchste eingesetzte Konzentration von 10 µM erreichte ein Sekretionsmaximum von  $295,4 \pm 37,8$  % ( $P < 0,01$ ).



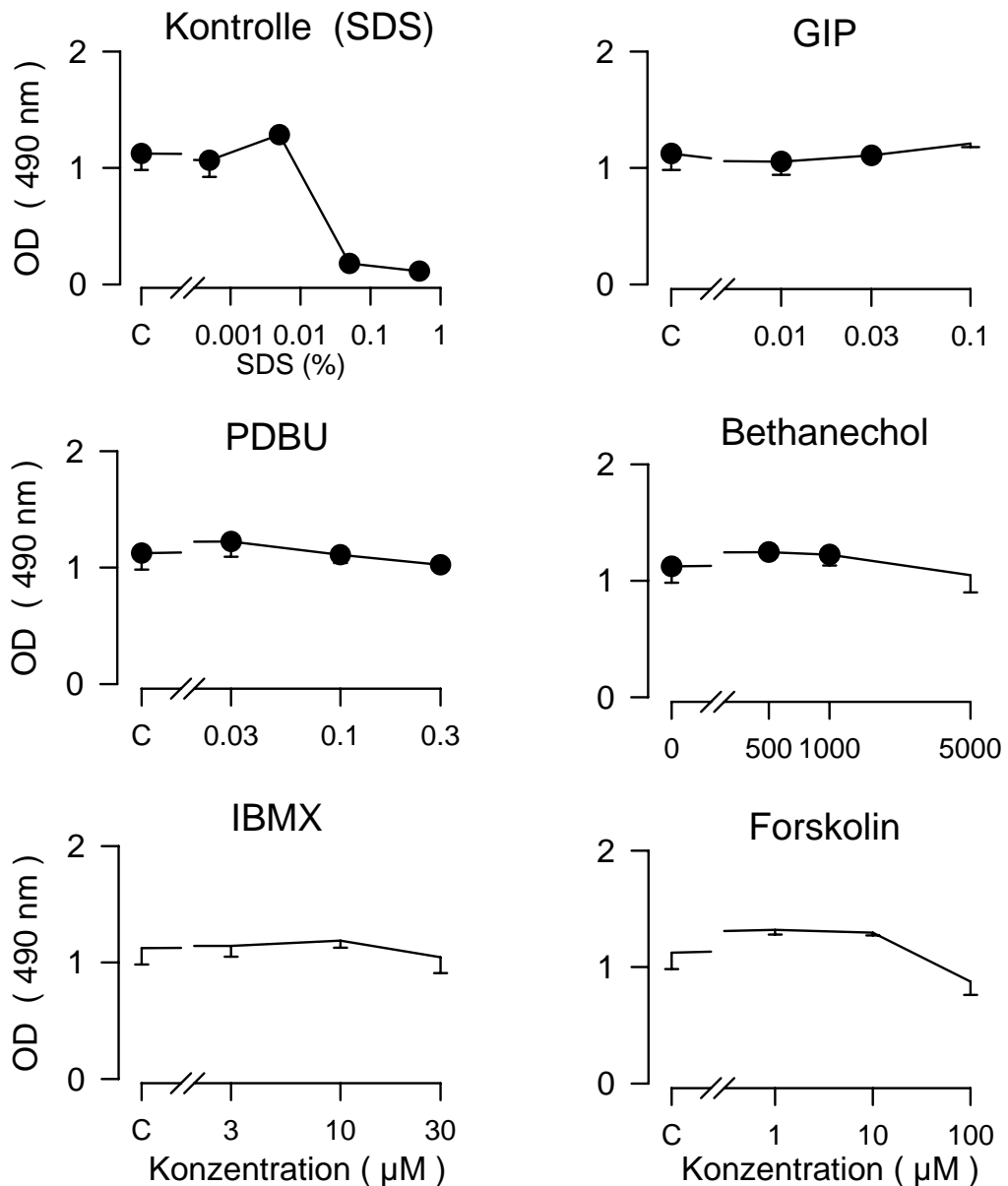
**Abb. 3-18:** Einfluß von Bombesin in unterschiedlichen Konzentrationen auf die GLP-1 Sekretion an GLUTag-Zellen. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 2 h in DMEM mit 0,5 % FCS. Anschließend wurde GLP-1 aus dem Überstand mittels reverser Festphasenextraktion extrahiert und quantitativ bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert (0 μM Bombesin). Werte als Mittelwert ± SEM. n = 3.

### 3.4.3 Toxizitätsuntersuchungen der getesteten Substanzen

Um mögliche toxische Effekte der eingesetzten Substanzen auf GLUTag-Zellen ausschließen zu können, wurde ein Zellproliferationstest durchgeführt. Der dafür verwendete MTS-Test beruht auf der Reduktion des Tetrazolium-Derivats MTS durch Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen. Das gebildete Formazan wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt.

Folgende Substanzen wurden auf ihre Toxizität an GLUTag-Zellen untersucht: PDBU in Konzentrationen von 0,03 bis 0,3 μM; Forskolin in Konzentrationen von 10 bis 100 μM; IBMX in Konzentrationen von 3 bis 30 μM; Bethanechol in Konzentrationen von 500 bis 5000 μM und GIP in Konzentrationen von 0,01 bis 0,1 μM. Als Kontrolle wurde das Tensid SDS in Konzentrationen von 0,001 bis 1 % eingesetzt. Die Zellen wurden für 24 h mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert.

SDS zeigte konzentrationsabhängige toxische Effekte an GLUTag-Zellen (Abb. 3-19). Alle anderen Substanzen zeigten nach einer Inkubationszeit von 24 h keine toxischen Effekte. Damit darf als bestätigt gelten, daß GLP-1 Stimulationseffekte der Substanzen nach einer zwei-stündigen Inkubationszeit nicht auf toxische Effekte zurückzuführen sind.



**Abb. 3-19:** Toxizitätsuntersuchungen mit SDS, GIP, PDBU, Bethanechol, IBMX und Forskolin in unterschiedlichen Konzentrationen an GLUTag-Zellen mittels MTS-Test. Die Zellen wurden für 24 h mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Der Test beruht auf der Reduktion des Tetrazolium-Derivats MTS durch Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen. Das gebildete Formazan wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt. Werte als Mittelwert  $\pm$  SEM. n = 4.

### **3.5 UNTERSUCHUNGEN ZU MUSKARINERGEN REZEPTOREN AN DER GLUTAG-ZELLINIE**

Vorangegangene Versuche charakterisierten die GLUTag-Zelllinie in Bezug auf Wachstums- und Sekretionseigenschaften; die Präsenz des enteroendokrinen Peptids GLP-1 konnte in allen Zellen mittels Fluoreszenzmarkierungen und Konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) nachgewiesen werden. Pharmakologische Versuche zeigten, daß die bekannten Signaltransduktionswege der L-Zelle in GLUTag-Zellen vorhanden und funktionell intakt sind. Davon ausgehend wurde die Rolle muskarinergere Rezeptoren im Rahmen der GLP-1 Regulation untersucht. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden mehrere experimentelle Ansätze verwendet. Die Präsenz muskarinergere Rezeptoren auf der Zelloberfläche wurde mittels Immunofluoreszenzmarkierungen untersucht; die funktionelle Verknüpfung muskarinergere Rezeptoren mit der GLP-1 Sekretion wurde pharmakologisch bearbeitet. Auf molekularer Ebene wurde auf das Vorhandensein von mRNA der einzelnen Rezeptorsubtypen mittels RT-PCR geprüft.

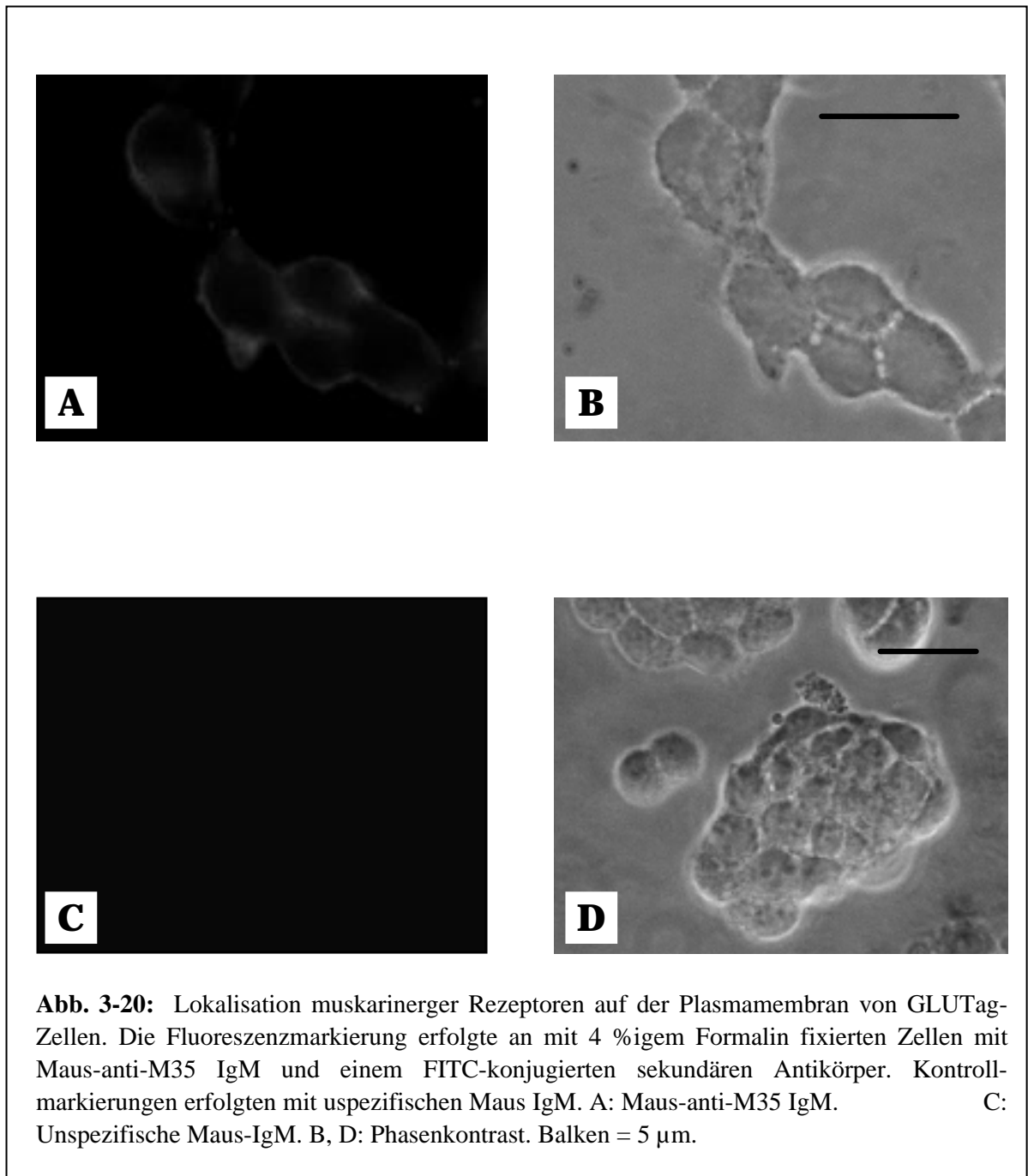
#### **3.5.1 M35 Fluoreszenzmarkierungen**

Formalin-fixierte und permeabilisierte GLUTag-Zellen wurden mit dem muskarinergen Antikörper M35 und einem FITC-markierten zweiten Antikörper inkubiert. Der monoklonale Antikörper M35 ist gegen das muskarinergere Rezeptorprotein gerichtet und detektiert alle fünf bekannten Subtypen (Carsi-Gabrenas et al., 1997).

Die immunofluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigt, daß alle GLUTag-Zellen M35-immunopositiv sind (Abb. 3-20 A). Die Fluoreszenzmarkierung ist auf der Zelloberfläche lokalisiert, und die Fluoreszenzintensität ist gleichmäßig über das Präparat verteilt, was auf die gleichmäßige Expression der muskarinergere Rezeptoren hinweist. Abb. 3-20 B zeigt die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme auf der die gute Strukturhaltung der Formalin-fixierten Zellen zu erkennen ist. Zur Kontrolle der Spezifität der Markierung wurden unspezifische Maus-IgM verwendet. Abb. 3-20 C zeigt, daß praktisch kein unspezifischer Fluoreszenzhintergrund zu verzeichnen ist.

#### **3.5.2. Pharmakologische Studien mit muskarinergere Modulatoren**

Zum Nachweis der funktionellen Verknüpfung muskarinergere Rezeptoren mit der GLP-1 Sekretion wurden pharmakologische Studien mit dem Agonisten Bethanechol und dem unspezifischen Antagonisten Atropin durchgeführt.

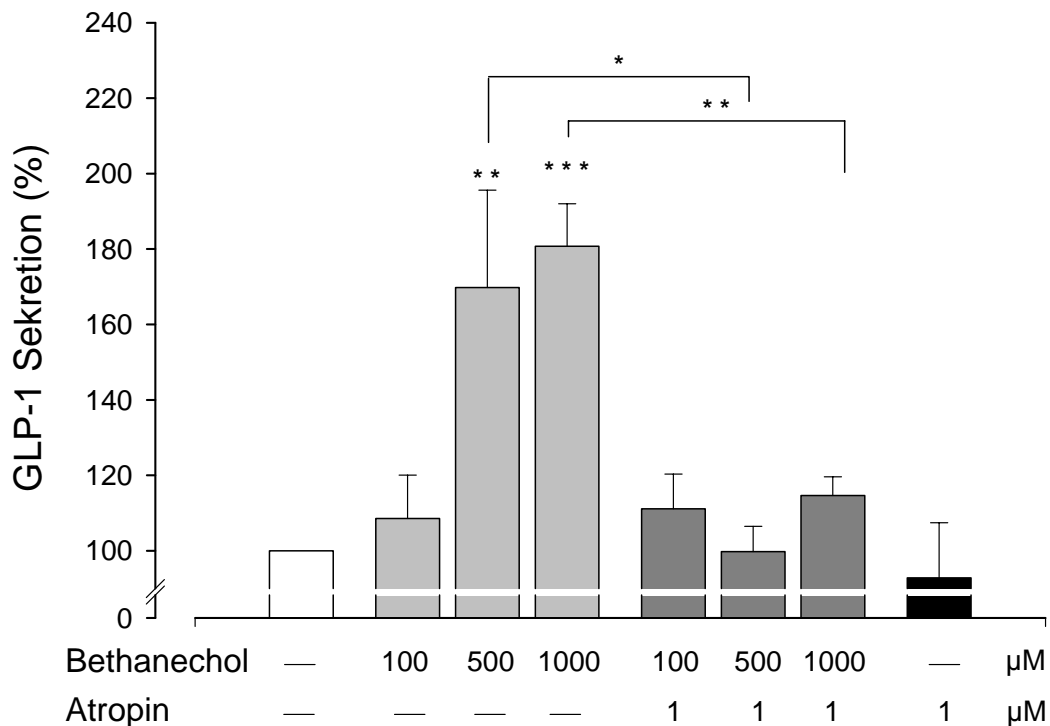


Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse zum Sekretionsverhalten unterschiedlicher GLUTag Zellchargen wurden die Versuche mit Zellen der Passagen x+1 bis x+7 der Charge GLUTag Charge D94 durchgeführt. Diese Passagen erwiesen sich in Bezug auf die GLP-1 Sekretionseigenschaften nach PDBU oder GIP Stimulation als stabil. Die zweistündige Inkubation mit 500 oder 1000 µM Bethanechol führte zu einer Steigerung der GLP-1 Sekretion auf  $169,8 \pm 25,9 \%$  ( $P < 0,01$ ) und  $180,8 \pm 11,3 \%$  ( $P < 0,001$ ) bezogen auf die Basalsekretion (Abb. 3-21). Eine Konzentration von 100 µM Bethanechol hatte keinen signifikanten Einfluß auf die GLP-1 Sekretion. Der Zusatz von 1 µM Atropin zu 500 oder

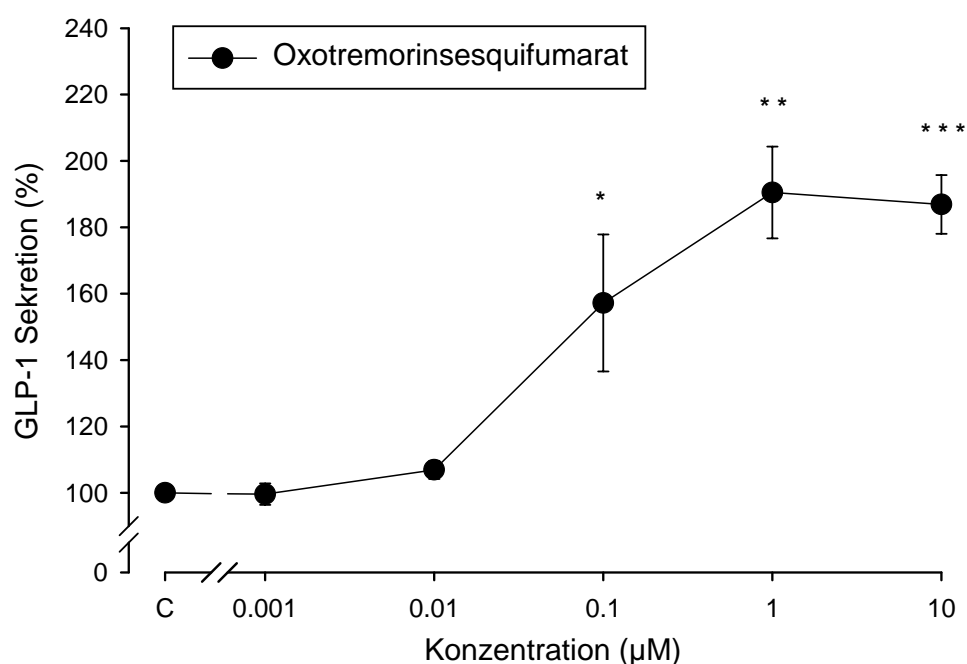
1000  $\mu\text{M}$  Bethanechol über eine Inkubationszeit von zwei Stunden antagonisierte den Effekt von Bethanechol bei beiden Konzentrationen vollständig ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$ ). Eine zweistündige Inkubation mit dem Antagonisten Atropin alleine hatte keinen Einfluß auf die GLP-1 Sekretion.

Neben pharmakologischen Studien mit Bethanechol und Atropin wurde außerdem der Einfluß des potenten muskarinergen Agonisten Oxotremorinesquifumarat auf die GLP-1 Sekretion untersucht. Inkubationsversuche über einen Zeitraum von zwei Stunden führten bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Steigerung der GLP-1 Sekretion auf  $157,2 \pm 19,0 \%$  ( $P < 0,05$ ) bezogen auf die Basalsekretion (Abb. 3-22). Das Sekretionsmaximum von  $190,5 \pm 13,8 \%$  ( $P < 0,01$ ) wurde bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  erreicht.

Bethanechol Sekretionsversuche an Zellen der GLUTag Charge D94 in Passagen höher als  $x+7$  bestätigten die nach PDBU- und GIP-Inkubation beobachtete Abnahme der GLP-1 Sekretionsleistung. Ab Passage  $x+9$  konnte keine Bethanechol-induzierte GLP-1 Sekretion mehr gemessen werden (nicht gezeigt).



**Abb. 3-21:** GLP-1 Stimulations-Inhibitionsversuche mit Bethanechol und Atropin an GLUTag-Zellen. Die Inkubation über einen Zeitraum von 2 h erfolgte mit unterschiedlichen Bethanechol-Konzentrationen. Außerdem wurde der Einfluß von 1  $\mu\text{M}$  Atropin auf die GLP-1 Sekretion in Gegenwart unterschiedlicher Bethanechol-Konzentrationen untersucht. Der Antagonist Atropin wurde auch alleine getestet. Werte als Mittelwerte  $\pm$  SEM.  $n = 6$ .

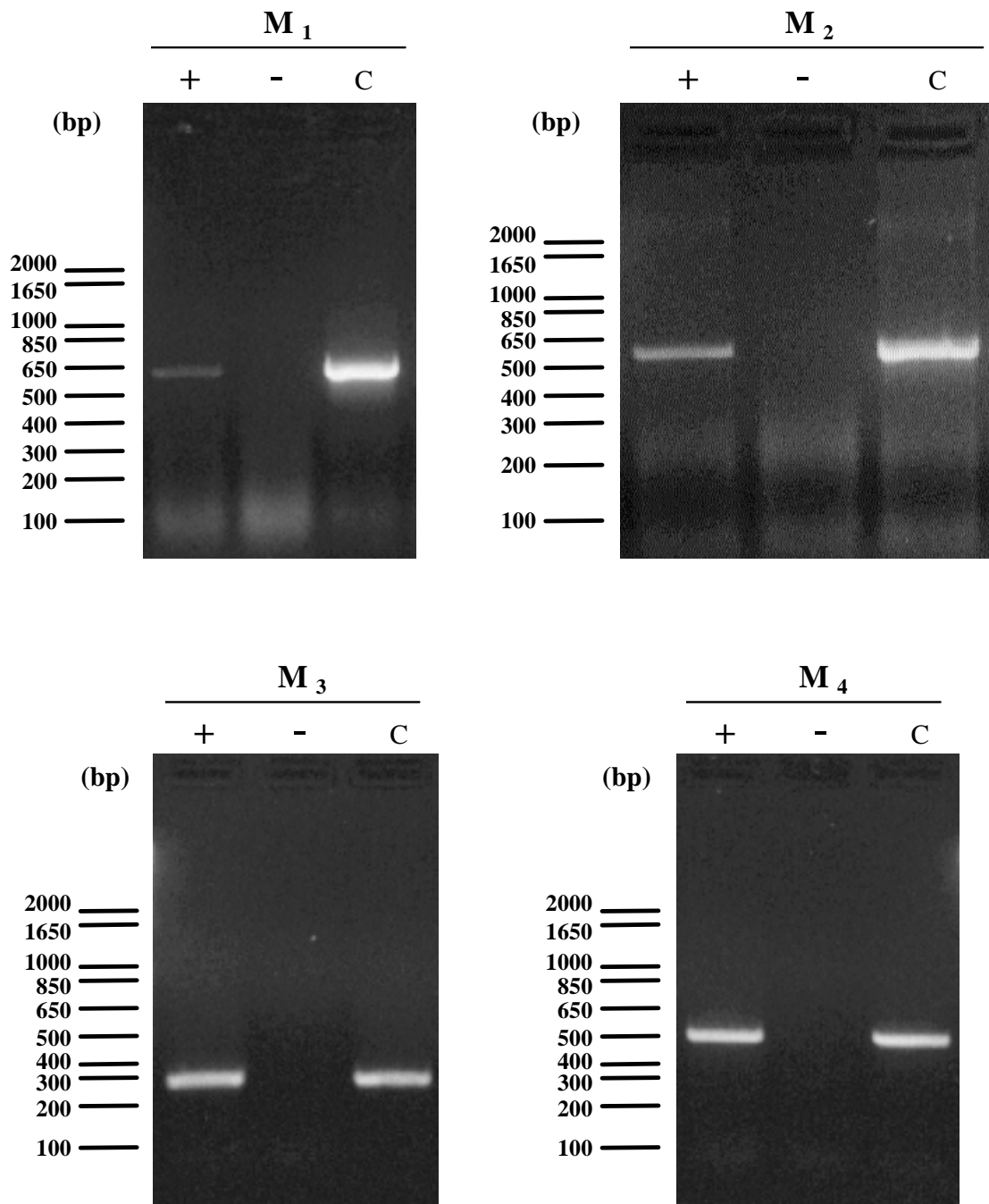


**Abb. 3-22:** Einfluß von Oxotremorinesquifumarat in unterschiedlichen Konzentrationen auf die GLP-1 Sekretion an GLUTag-Zellen. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 2 h in DMEM mit 0,5 % FCS. Anschließend wurde GLP-1 aus dem Überstand mittels reverser Festphasenextraktion extrahiert und quantitativ bestimmt. Die GLP-1 Sekretion ist in % angegeben und bezieht sich auf den Basalwert (0 μM Oxotremorinesquifumarat). Werte als Mittelwert ± SEM. n = 4.

### 3.5.3 Charakterisierung muskarinergere Rezeptorsubtypen mittels RT-PCR

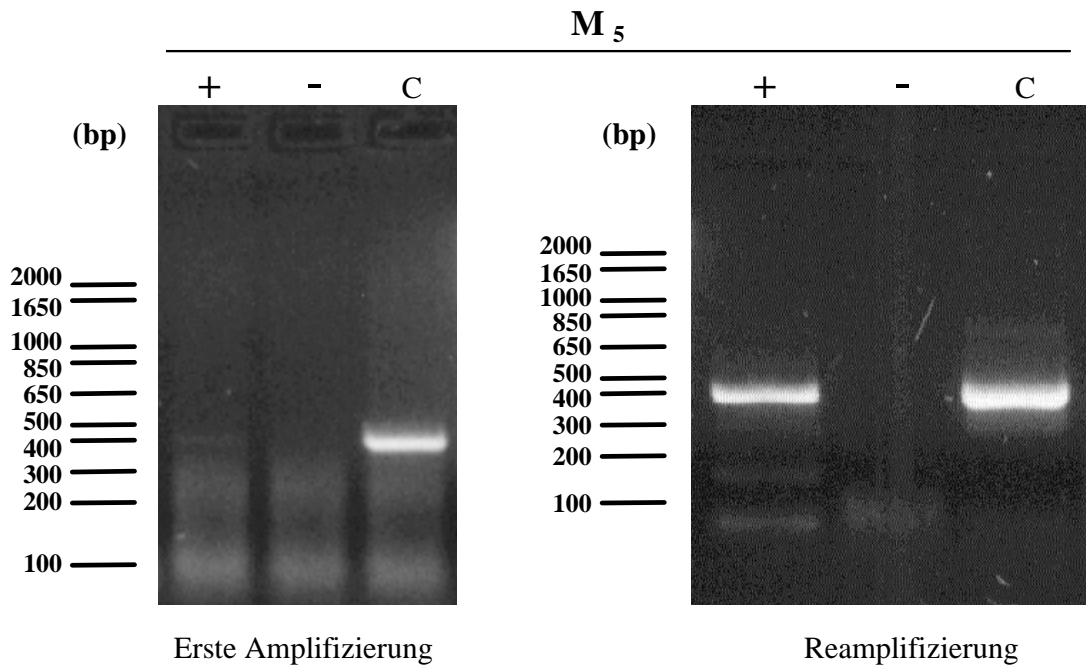
Fluoreszenzmarkierungen mit dem nichtselektiven muskarinergen Antikörper M35 demonstrierten die Präsenz muskarinergere Rezeptoren auf GLUTag-Zellen, ohne eine Aussage über vorhandene Rezeptorsubtypen zu ermöglichen.

Zur Untersuchung der Expression spezifischer Rezeptorsubtypen wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Dazu wurde GLUTag RNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Für jeden der fünf bekannten muskarinergere Rezeptorsubtypen wurden spezifische Primerpaare entwickelt, die dann in einer PCR zur Amplifikation eines entsprechenden subtypspezifischen cDNA-Fragments eingesetzt wurden. Mit dieser Methode konnte cDNA aller fünf Rezeptorsubtypen nachgewiesen werden. Abb. 3-23 und Abb. 3-24 zeigen die Agarosegele der M<sub>1</sub> bis M<sub>5</sub> cDNA PCR Produkte. M<sub>1</sub> und M<sub>2</sub> cDNA ergaben im Vergleich zur Positivkontrolle ein schwaches Signal auf dem Gel, während M<sub>3</sub> und M<sub>4</sub> starke Banden zeigten (Abb. 3-23). Um auf dem Agarosegel eine deutlich sichtbare Bande zu erhalten, mußte M<sub>5</sub> cDNA reamplifiziert werden.



**Abb. 3-23:** RT-PCR zum Nachweis der Expression muskarinergere Rezeptorsubtypen in GLUTag-Zellen (+). PCR-Fragmente spezifisch für M<sub>1</sub> bis M<sub>4</sub> wurden auf 1,5 %igen Agarosegelen getrennt. In den Negativkontrollen wurde keine reverse Transkription durchgeführt (-). Als Positivkontrolle diente Gesamt-RNA aus Mäusegehirn (C).





**Abb. 3-24:** RT-PCR zum Nachweis der Expression von M<sub>5</sub> mRNA in GLUTag-Zellen (+). Das PCR-Fragment der ersten Amplifizierung mußte reamplifiziert werden. In den Negativkontrollen wurde keine reverse Transkription durchgeführt (-). Als Positivkontrolle diente Gesamt-RNA aus Mäusegehirn (C).

Die M<sub>1</sub> bis M<sub>5</sub> cDNA Fragmente hatten die erwarteten Größen von 641 bp, 552 bp, 310 bp, 510 bp und 400 bp. Als Positivkontrolle diente Gesamt RNA aus dem Gehirn der Maus. In den Negativkontrollen wurde der reverse Transkriptionsschritt weggelassen, um somit auf Kontaminationen durch genomische DNA zu prüfen. Alle PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert.

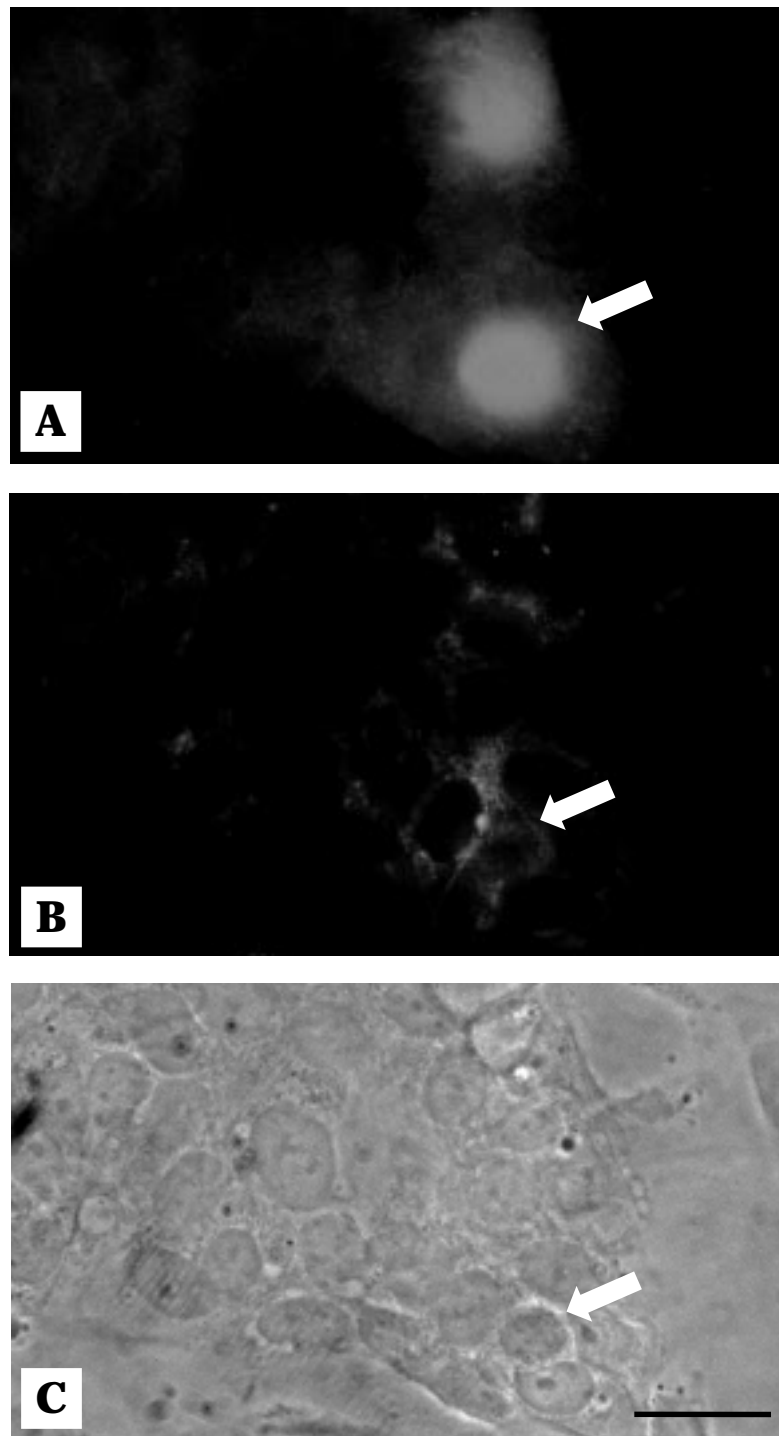
Da die Wachstums- und Sekretionseigenschaften der GLUTag-Zelllinie zwischen den einzelnen Zellchargen stark variierten, wurden die GLUTag Chargen D94 und D97 auf die Präsenz von mRNA muskariniger Rezeptorsubtypen untersucht. Die RT-PCR beider Chargen ergab identische Ergebnisse (nicht gezeigt). Es können somit keine passagenspezifischen Eigenschaften in Bezug auf die Präsenz von mRNA muskariniger Rezeptorsubtypen beobachtet werden. Die dargestellten Ergebnisse stammen von Versuchen mit der GLUTag Charge D94.

### **3.6 UNTERSUCHUNGEN ZU MUSKARINERGEN REZEPTOREN AN FÖTALEN RATTENDARMZELLEN (FRIC)**

Die Präsenz muskarinergere Rezeptoren und die funktionelle Verknüpfung der Rezeptoren mit der GLP-1 Sekretion konnte an der GLUTag-Zelllinie erstmals nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.5). Muskarinergere Rezeptorsubtypen wurden mittels RT-PCR charakterisiert. Darauf aufbauend wurde die Präsenz muskarinergere Rezeptoren an fötalen Rattendarmzellen (FRIC) mittels Fluoreszenzmarkierungen untersucht.

Da bei FRIC-Kulturen eine heterogene Zellpopulation vorlag, wären einfache Fluoreszenzmarkierungen mit dem muskarinergere Antikörper M35 nicht sinnvoll gewesen. Bei diesen Markierungen wäre eine Zuordnung der unterschiedlichen Zelltypen nicht möglich gewesen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Doppelfluoreszenzmarkierungen eingesetzt, bei der gleichzeitig mit zwei Antikörpern inkubiert wurde, in diesem Fall mit GLP-1 (7-37)-Antiserum und dem muskarinergere Antikörper M35. Die anschließende Detektion erfolgte mit einem FITC-konjugierten bzw. Cy3-konjugierten sekundären Antikörper.

Abb. 3-25 A zeigt die Fluoreszenzmarkierungen fötaler Rattendarmzellen mit GLP-1 (7-37)-Antiserum und einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper. Am rechten Rand der Präparation sind zwei GLP-1 immunopositive Zellen zu erkennen. Da der fluoreszenzmarkierte Antikörper stark überstrahlte, sind keine GLP-1 Granula zu erkennen. Die zweite Markierung mit dem muskarinergere Antikörper M35 und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper zeigt, daß fast alle Zellen schwach immunopositiv sind (Abb. 3-25 B). Die untere GLP-1 immunopositive Zelle ist in allen Aufnahmen durch einen Pfeil kenntlich gemacht. Die benachbarte Zelle ist M35-immunopositiv und hebt sich deutlich vom Hintergrund ab. In Bezug auf eine direkte M35-Markierung der unteren GLP-1 immunopositiven L-Zelle kann jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden. Die Fluoreszenzintensität der M35-Markierung der oberen L-Zelle liegt nicht über der Intensität des Hintergrunds. Die Phasenkontrastaufnahme (Abb. 3-25 C) demonstriert die gute Strukturhaltung der fötalen Rattendarmzellen nach Formalinfixation.



**Abb. 3-25:** Doppelmarkierung von GLP-1 und M35 an fötalen Rattendarmzellen (FRIC). Die mit 4 %igem Formalin fixierten Zellen wurden mit Kaninchen-anti-GLP-1 (7-37)-Antiserum und Maus-anti-M35 IgM inkubiert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit FITC- und Cy3-konjugierten sekundären Antikörpern. A: GLP-1 (7-37)-Antiserum. B: Anti-M35 IgM. C: Phasenkontrast. Balken = 5  $\mu$ m.

### **3.7 UNTERSUCHUNGEN ZU INSULINREZEPTOREN AN DER GLUTAG-ZELLINIE**

Neben den Untersuchungen zu muskarinergen Rezeptoren und deren Einfluß auf die GLP-1 Sekretion stellten Untersuchungen zu Insulinrezeptoren mit möglicherweise inhibitorischen Eigenschaften auf die GLP-1 Freisetzung ein weiteres zentrales Thema der Arbeit dar. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden mehrere experimentelle Ansätze verwendet. Die Präsenz von Insulinrezeptoren auf der Zelloberfläche wurde mittels Immunopräzipitation nach Oberflächenbiotinylierung untersucht. Außerdem wurden *insulin receptor substrate-1* (IRS-1) Fluoreszenzmarkierungen an GLUTag-Zellen durchgeführt. Auf molekularer Ebene wurde RT-PCR zum Nachweis von Insulinrezeptor mRNA eingesetzt. Die potentielle funktionelle Verknüpfung von Insulinrezeptoren und GLP-1 Inhibition wurde pharmakologisch bearbeitet.

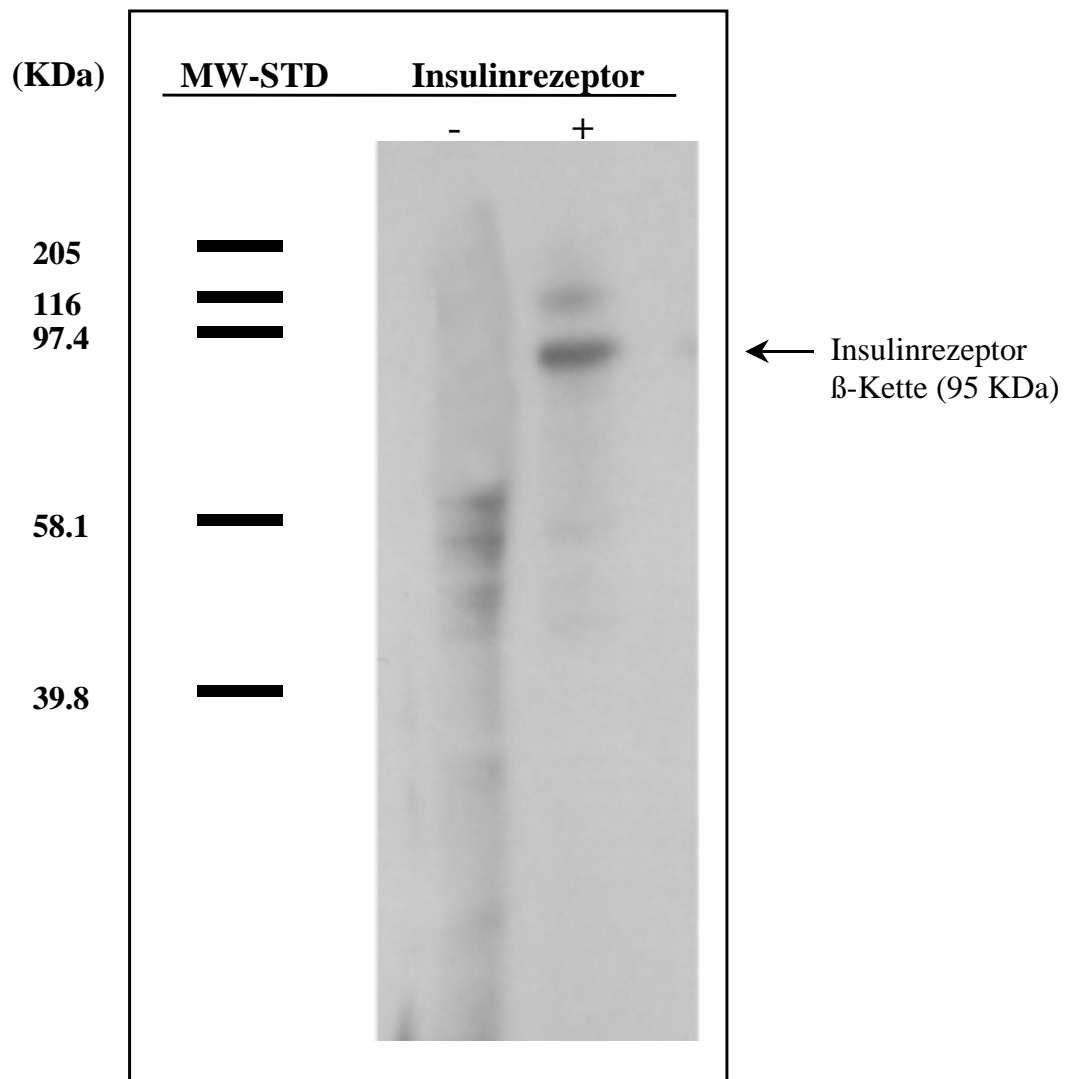
#### **3.7.1 Immunopräzipitation von Insulinrezeptoren nach Oberflächenbiotinylierung**

Da die meisten uns bekannten kommerziell erhältlichen Insulinrezeptor-Antikörper für Fluoreszenzmarkierungen nur bedingt geeignet waren, wurde ein alternativer experimenteller Ansatz gewählt, der es erlaubte eine Aussage über Oberflächenrezeptoren auf Zellen zu treffen. Oberflächenproteine auf GLUTag-Zellen wurden zuerst biotinyliert und anschließend mit einem Insulinrezeptor-spezifischen Antikörper (AB3) immunopräzipitiert. Diese sensitive proteinchemische Methode demonstrierte die Präsenz von Insulinrezeptoren auf GLUTag-Zellen (Abb. 3-26). Nach SDS-Page, Western-Blot und anschließendem Luminol-Nachweis war eine signifikante Bande bei 95 KDa zu erkennen, die der  $\beta$ -Kette des Insulinrezeptors entspricht. Die Kontrollimmunopräzipitation mit unspezifischen Maus-IgM ergab kein Signal bei 95 KDa (Abb. 3-26). Dies bestätigte die Spezifität der Immunopräzipitation mit dem Insulinrezeptor-Antikörper (AB-3).

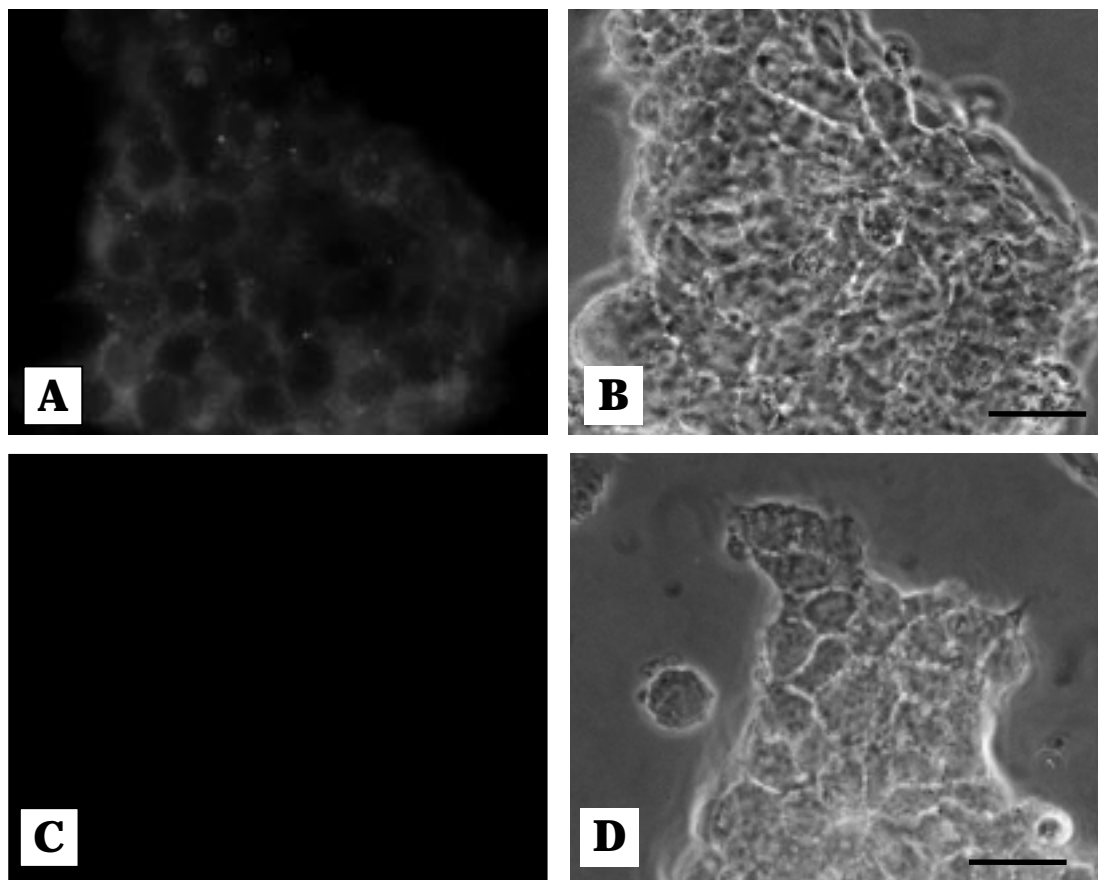
#### **3.7.2 IRS-1 Fluoreszenzmarkierungen an der GLUTag-Zelllinie**

Die Präsenz von *insulin receptor substrate-1* (IRS-1), einem wichtigen Substrat der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase, wurde mittels Fluoreszenzmarkierungen untersucht. Dazu wurden Maus-anti-IRS-1 IgM und ein FITC-konjugierter sekundärer Antikörper eingesetzt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigte, daß alle GLUTag-Zellen IRS-1 immunopositiv sind (Abb. 3-27 A). Die Markierung ist im Zytoplasma lokalisiert, und die Fluoreszenzintensität ist gleichmäßig über das Präparat verteilt. Die Strukturhaltung der Zellen nach Formalinfixation ist nur mäßig; allerdings hatte dies keinen Einfluß auf die Markierung (Abb. 3-27 B). Zur Kontrolle der Spezifität der Markierung wurden unspezifische Maus-IgM eingesetzt. Abb. 3-27 C zeigt, daß praktisch kein unspezifisches Hintergrundsignal

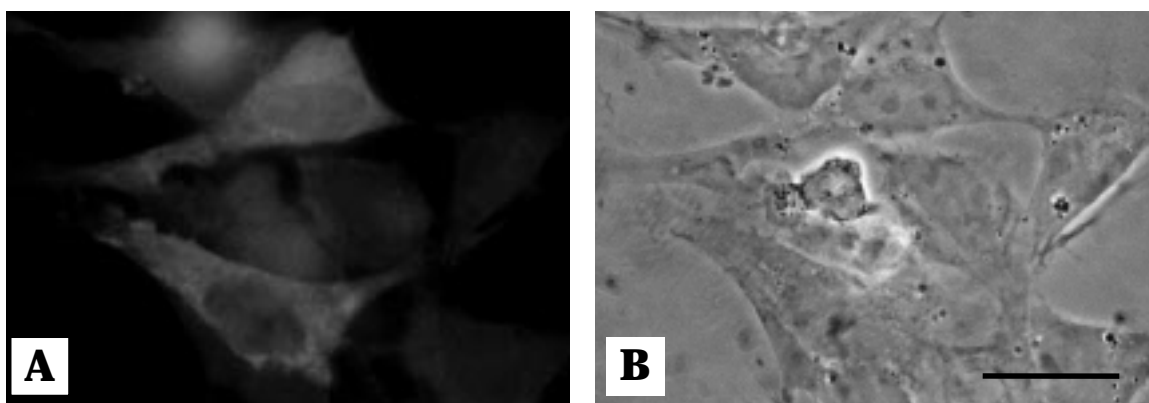
vorliegt. IRS-1 Fluoreszenzmarkierungen wurden an den GLUTag Chargen D94 und R98 durchgeführt. Beide Versuchsreihen demonstrierten die Präsenz von IRS-1 im Zytoplasma unabhängig von der Passagenzahl der Zellen (nicht gezeigt). Obwohl eine Abnahme der Sekretionsleistung der GLUTag-Zellen bereits nach der Passage x+7 zu beobachten war (siehe Tabelle 3-4), konnte IRS-1 auch in höheren Passagen detektiert werden. Die Versuche wurden bis zur Passage x+16 durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus Versuchen mit der GLUTag Charge D94.



**Abb. 3-26:** Immunopräzipitation von Insulinrezeptoren nach Oberflächenbiotinylierung an GLUTag-Zellen. Es wurden Anti-Insulinrezeptor-IgM (β-Kette) verwendet (+), als Kontrolle dienten unspezifische Maus-IgM (-). Der Nachweis der biotinylierten Proteine erfolgte mit Luminol.



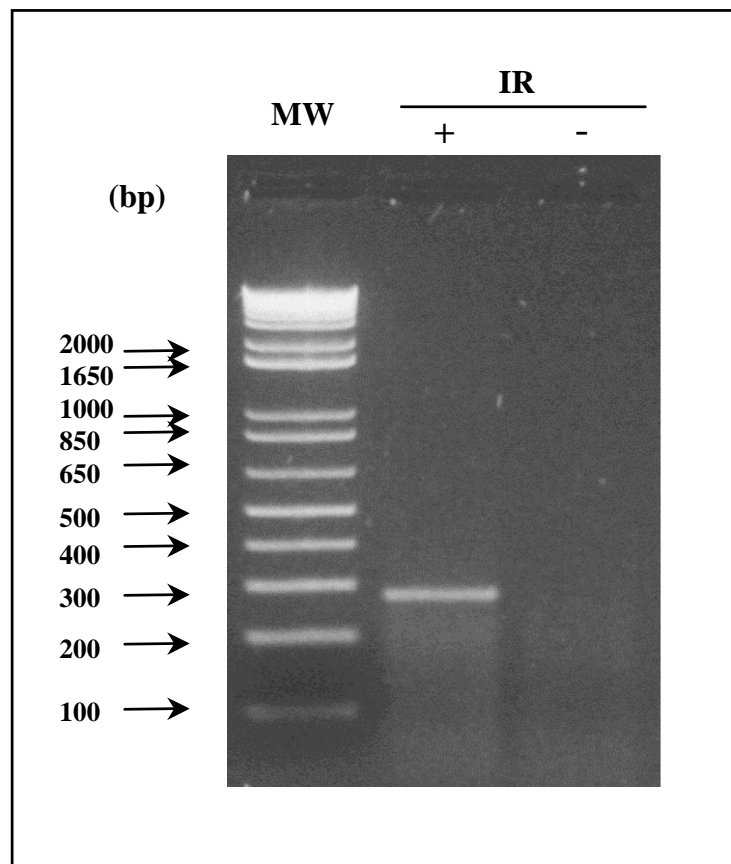
**Abb. 3-27:** Lokalisation von IRS-1 im Zytoplasma von GLUTag-Zellen. Die Fluoreszenzmarkierung der mit 4 %igem Formalin fixierten Zellen erfolgte mit Maus-anti-IRS-1 IgM und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper. Als Kontrolle dienten unspezifische Maus IgM. A: Maus-anti-IRS-1 IgM. C: Unspezifische Maus-IgM. B, D: Phasenkontrast. Balken = 5  $\mu$ m.



**Abb. 3-28:** IRS-1-immunopositive Zellen in einer Kultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC). Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit Maus-anti-IRS-1 IgM und einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper. A: Maus-anti-IRS-1 IgM. B: Phasenkontrast. Balken = 5  $\mu$ m.

### **3.7.3 Nachweis von Insulinrezeptor mRNA mittels RT-PCR**

Zur Untersuchung der Expression von Insulinrezeptor mRNA in GLUTag-Zellen wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Dazu wurde Gesamt RNA aus GLUTag-Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Ein spezifisches Primerpaar wurde zur Amplifikation eines Insulinrezeptor cDNA Fragments eingesetzt. Das Agarosegel des PCR Produkts zeigt die erwartete Bande bei 300 bp (Abb. 3-29). Die Versuche wurden mit RNA aus Zellen der GLUTag Charge D94 durchgeführt.

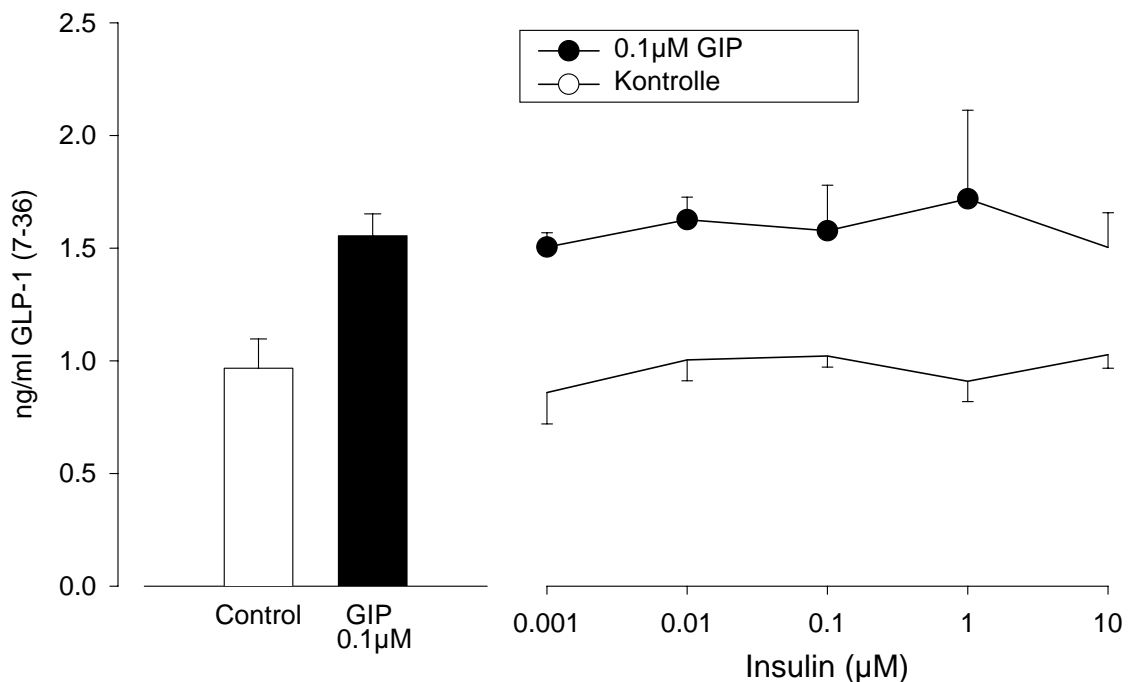


**Abb. 3-29:** RT-PCR zum Nachweis der Expression von Insulinrezeptoren in GLUTag-Zellen. Das Insulinrezeptor-spezifische PCR-Fragment wurde auf einem 1,5 %igen Agarosegel getrennt (+). In der Negativkontrolle wurde keine reverse Transkription durchgeführt (-).

### **3.7.4 Einfluß von Insulin auf die GLP-1 Sekretion**

In den vorangegangenen Versuchen wurde die Präsenz von Insulinrezeptoren auf der Zelloberfläche und des Rezeptorsubstrats IRS-1 im Zytoplasma mittels Immunopräzipitation und Fluoreszenzmarkierungen demonstriert; auf molekularer Ebene wurde Insulinrezeptor mRNA durch RT-PCR nachgewiesen. Darauf aufbauend wurde die potentielle funktionelle

Verknüpfung von Insulinrezeptoren mit der GLP-1 Sekretion pharmakologisch untersucht. Als Arbeitshypothese postulierten wir, daß eine GIP-induzierte GLP-1 Freisetzung durch Insulin blockiert werden kann. Dazu wurde gleichzeitig mit 0,1  $\mu\text{M}$  GIP und unterschiedlichen Insulinkonzentrationen über einen Zeitraum von zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Menge an sezerniertem GLP-1 im Versuchsmedium bestimmt. Das Balkendiagramm in Abb. 3-30 zeigt eine Steigerung der GIP-induzierten GLP-1 Sekretion um das 1,5-fache, bezogen auf die Basalsekretion. Da Zellen in Passagen höher als x+6 eingesetzt wurden, lag die beobachtete GLP-1 Sekretionsleistung unterhalb der im Rahmen der Sekretionsstudien ermittelten Werte (siehe Kapitel 3.4). Die gleichzeitige Inkubation mit GIP und unterschiedlichen Insulinkonzentrationen führte zu keiner signifikanten Inhibition der GLP-1 Freisetzung über einen Zeitraum von zwei Stunden. Insulin alleine hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die GLP-1 Sekretion.



**Abb. 3-30:** Sekretions-Inhibitionsversuche mit GIP und Insulin an GLUTag-Zellen. Im Balkendiagramm auf der linken Bildhälfte ist die Steigerung der GLP-1 Sekretion durch 0,1  $\mu\text{M}$  GIP dargestellt. Auf der rechten Hälfte ist der Einfluß unterschiedlicher Insulinkonzentrationen auf die GIP-induzierte GLP-1 Sekretion dargestellt (—●—). Außerdem ist der Einfluß unterschiedlicher Insulinkonzentrationen auf die GLP-1 Basalsekretion abgebildet (—○—). n = 3.

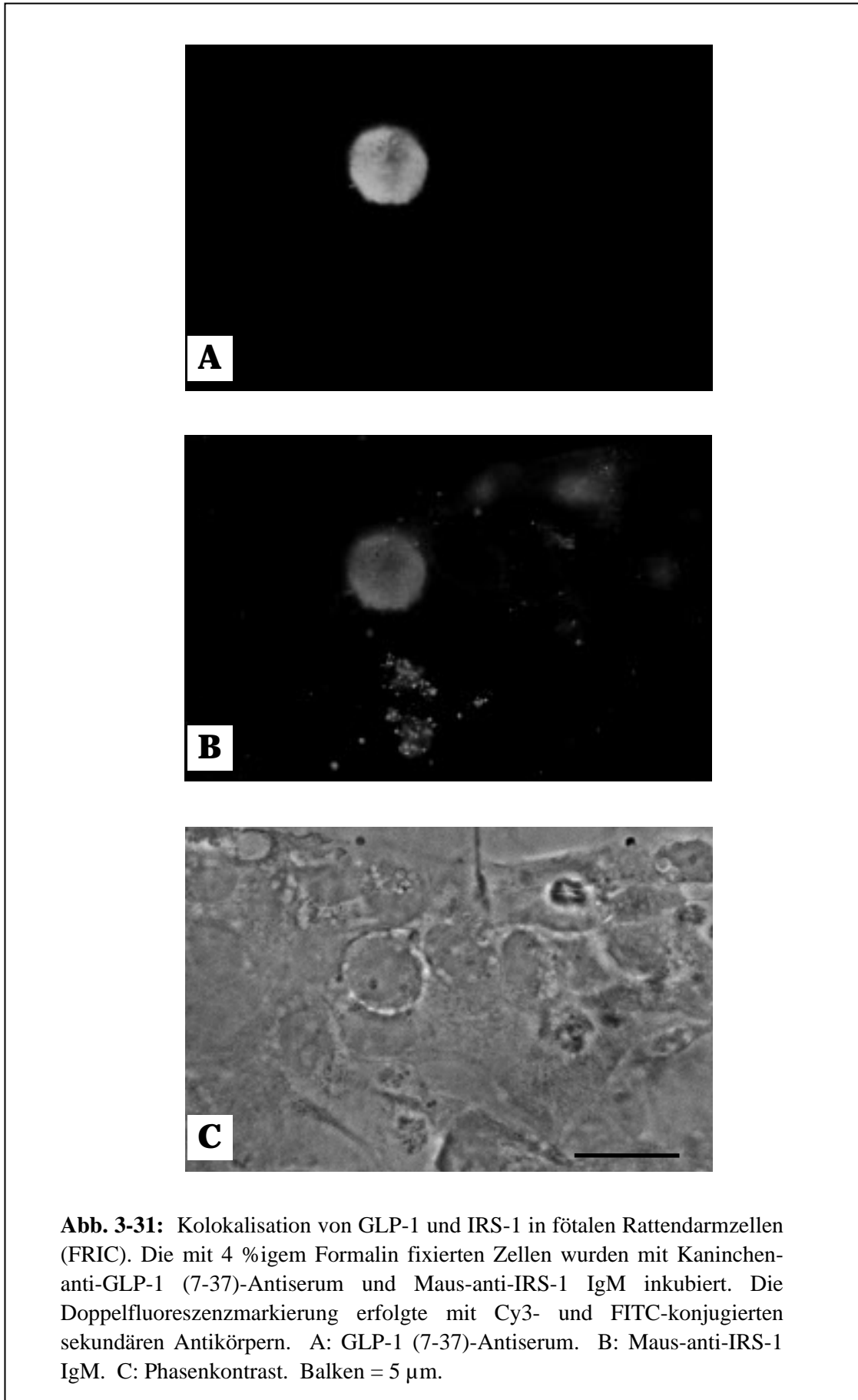


Im Rahmen der Inhibitionsversuche wurden rekombinantes Humaninsulin und Meerschweinchen-Insulin eingesetzt. Beide Versuchsansätze führten zu identischen Ergebnissen (nicht gezeigt). Da FCS kleine Mengen an Insulin enthält, wurden die Versuche zusätzlich in einer physiologischen Salzlösung (HBSS) durchgeführt, um eventuelle Einflüsse des fötalen Insulins ausschließen zu können. Es konnte kein Unterschied in Bezug auf die Beeinflussung der GLP-1 Sekretion zwischen FCS-haltigem DMEM und FCS-freiem HBSS beobachtet werden (nicht gezeigt).

### **3.8 UNTERSUCHUNGEN ZU INSULINREZEPTOREN AN FÖTALEN RATTEN-DARMZELLEN (FRIC)**

Die Versuche an GLUTag-Zellen demonstrierten die Präsenz von Insulinrezeptoren. Da die GLUTag-Zelllinie jedoch von Tumoren mit potentiell veränderten Regulationsmechanismen stammt wurden weiterführende Untersuchungen an nativen L-Zellen durchgeführt. Dazu wurden Fluoreszenzmarkierungen an fötalen Rattendarmzellen (FRIC) eingesetzt. Da kein kommerzieller Insulinrezeptor-Antikörper zur Verfügung stand, wurde ein IRS-1 Antikörper verwendet. Aufgrund der Heterogenität der Zellpopulation wurde im Rahmen von Doppelfluoreszenzmarkierungen gleichzeitig mit GLP-1 und IRS-1 Antikörpern inkubiert. Die anschließende Detektion erfolgte mit Cy3-konjugierten bzw. FITC-konjugierten zweiten Antikörpern.

In Abb. 3-31 A ist eine GLP-1-immunopositive L-Zelle mit Sekretgranula zu erkennen. Abb. 3-31 B zeigt, daß diese Zelle auch IRS-1-immunopositiv ist. Somit konnte erstmalig die Lokalisation von IRS-1 in nativen intestinalen L-Zellen demonstriert werden. Abb. 3-31 zeigt die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme, der mit 4 %igem Formalin fixierten Zellen.



**Abb. 3-31:** Kolokalisation von GLP-1 und IRS-1 in fötalen Rattendarmzellen (FRIC). Die mit 4 %igem Formalin fixierten Zellen wurden mit Kaninchen-anti-GLP-1 (7-37)-Antiserum und Maus-anti-IRS-1 IgM inkubiert. Die Doppelfluoreszenzmarkierung erfolgte mit Cy3- und FITC-konjugierten sekundären Antikörpern. A: GLP-1 (7-37)-Antiserum. B: Maus-anti-IRS-1 IgM. C: Phasenkontrast. Balken = 5 µm.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 METHODISCHE EVALUIERUNG

#### **4.1.1 Modelle zur Untersuchung der GLP-1 Regulation**

Die Etablierung der permanenten enteroendokrinen GLUTag-Zelllinie und einer Primärkultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC-Kultur) – zweier Modelle, die sich zur Untersuchung der GLP-1 Regulation in L-Zellen eignen – war das erste Ziel der vorliegenden Arbeit. Außerdem wurden im Rahmen der methodischen Evaluierung ein GLP-1 Assay etabliert und die Wachstums- und Sekretionseigenschaften der GLUTag-Zelllinie charakterisiert.

Es sind zahlreiche Modelle zur Untersuchung der GLP-1 Regulation in L-Zellen beschrieben. Die von Drucker und Mitarbeitern etablierte permanente GLUTag-Zelllinie stammt aus intestinalen, endokrinen Tumoren des Dickdarms von *proglucagon-simian virus 40 large T antigen* transgenen Mäusen (Drucker et al., 1992). Die GLUTag-Zelllinie ist molekularbiologisch gut charakterisiert und zeichnet sich durch ein Hormonmuster aus, das dem der nativen L-Zelle sehr ähnlich ist. In GLUTag-Zellen wurden unter anderem Oxyntomodulin, Glicentin, GLP-1 und GLP-2 nachgewiesen (Drucker et al., 1992; Drucker et al., 1994)

Außerdem wurde die STC-1 Zelllinie als L-Zellmodell beschrieben (Abello et al., 1994). Diese Zelllinie stammt ebenfalls aus intestinalen Tumoren. Als L-Zellmodell ist diese Zelllinie jedoch ungenügend charakterisiert. An nativen L-Zellen spielt die Proteinkinase A (PKA) eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der GLP-1 Sekretion und Biosynthese. An der STC-1 Zelllinie war jedoch keine PKA-vermittelte GLP-1 Freisetzung zu verzeichnen (Brubaker, unveröffentlichte Daten). Außerdem weist die STC-1 Zelllinie ein Hormonmuster auf, das sich deutlich von nativen L-Zellen unterscheidet.

Zur Untersuchung der GLP-1 Regulation an Primärkulturen wurden eine Kultur fötaler Rattendarmzellen (Brubaker und Vranic, 1997) und eine Kultur angereicherter L-Zellen des Hundedarms (Buchan et al., 1987) eingesetzt. Zur Präparation fötaler Rattendarmzellen wurde der Darm entnommen und enzymatisch verdaut, so daß eine heterogene Zellpopulation vorlag. FRIC-Kulturen wurden bereits umfassend charakterisiert und dienten in der Vergangenheit als wichtiges Modell zur Untersuchung der GLP-1 Regulation an L-Zellen (Brubaker und Vranic, 1987; Brubaker, 1988; Brubaker, 1991; Rocca und Brubaker, 1995).

Außerdem finden zahlreiche isoliert perfundierte Organmodelle zur Charakterisierung der GLP-1 Regulation in der Literatur Erwähnung (Plaisancie et al., 1994; Dumoulin et al., 1995; Herrmann-Rinke et al., 1995).

Wie bereits einleitend aufgeführt, wurden im Rahmen dieser Arbeit die GLUTag-Zelllinie und FRIC-Kulturen zur Untersuchung der GLP-1 Regulation an L-Zellen eingesetzt. Die GLUTag-Zelllinie bietet den Vorteil, daß sie eine näherungsweise homogene Zellpopulation darstellt und bereits molekularbiologisch gut charakterisiert wurde. Die eingesetzten FRIC-Kulturen bieten gegenüber der Primärkultur angereicherter L-Zellen des Hundedarms den Vorteil, daß die Präparation weniger aufwendig und kostengünstiger ist. Außerdem wurden FRIC-Kulturen in Bezug auf die GLP-1 Regulation pharmakologisch bereits umfangreich charakterisiert (Brubaker und Vranic, 1987; Brubaker, 1988; Brubaker, 1991; Rocca und Brubaker, 1995).

#### **4.1.2 Wachstums- und Sekretionseigenschaften der GLUTag-Zelllinie**

Aufgrund der unzureichenden pharmakologischen Charakterisierung der GLUTag-Zelllinie war es von Bedeutung, die Wachstums- und Sekretionseigenschaften zu untersuchen, um die Tauglichkeit als L-Zellmodell zur Untersuchung der GLP-1 Regulation zu bewerten.

Dazu wurden die GLUTag Chargen D94, D97 und R98 getestet - es konnte unterschiedliches Wachstumsverhalten der einzelnen Zellchargen beobachtet werden (siehe Abb. 3.1). Obwohl alle Zellchargen zu Beginn konstantes Wachstum aufwiesen, das anstieg, um schließlich ein Plateau zu erreichen, waren sowohl der Zeitpunkt des Anstiegs als auch die Steilheit sehr unterschiedlich. Die Wachstumskurve der GLUTag Charge D94 stieg nach der Passage x+8 steil an, während bei der GLUTag Charge R98 bereits nach der Passage x+3 ein steiler Anstieg zu beobachten war. Der Anstieg der Wachstumskurve der GLUTag Charge D97 war dagegen graduell und flacher. Vergleicht man diese Beobachtungen mit den Ergebnissen aus den GLP-1 Sekretionsstudien mit GIP und PDBU, fällt auf, daß die Wachstums- und Sekretionseigenschaften eng verknüpft sind.

Das duodenale Peptid GIP und der Phorbolster PDBU steigerten nur an der GLUTag Charge D94 die GLP-1 Sekretion. Beide Substanzen führten zu einer signifikanten Steigerung der GLP-1 Sekretion zwischen den Passagen x+2 und x+7. Nach der Passage x+7 war eine Abnahme der Sekretionsleistung zu beobachten, die bei GIP etwas früher als bei PDBU auftrat, so daß schließlich ab der Passage x+11 keine Steigerung der GLP-1 Sekretion mehr zu beobachten war. PDBU stimulierte auch bei dieser Passage noch die Freisetzung des enteroendokrinen Peptids. Die Abnahme der Sekretionsleistung ging einher mit zunehmendem Wachstum der Zellen ab der Passage x+9. Das duodenale Peptid GIP führte zu keiner Steigerung der GLP-1 Sekretion an der GLUTag Charge R98 - der Phorbolster PDBU führte

nur zu einer schwachen Steigerung der Sekretion. Auch an der GLUTag Charge D97 führte GIP nicht zu einer Steigerung der GLP-1 Sekretion, während PDBU auch hier zu einem Anstieg der Sekretionsleistung führte, die jedoch ab der Passage x+9 abnahm.

Da die Abnahme der GLP-1 Sekretionsleistung zuerst bei GIP, einer Substanz mit oberflächenrezeptorvermitteltem Wirkmechanismus beobachtet wurde, bestand die Vermutung, daß das eingesetzte Trypsin einen negativen Einfluß auf die Rezeptoren haben könnte. Jedoch zeigten Untersuchungen mit ECD light und einem enzymfreien Dissoziationsreagenz, daß Trypsin keinen direkten Einfluß auf die GLP-1 Sekretionsleistung hatte. Außerdem führte der Einsatz dieser alternativen Reagenzien zu einem starken Verklumpen der Zellen.

Auch das Variieren der Ruhephasen, d.h. der Zeit zwischen dem Aussäen der Zellen und dem Stimulationsversuch, hatte keinen Einfluß auf das Sekretionsverhalten. Es ist davon auszugehen, daß sich beim Trypsinieren potentiell geschädigte Oberflächenrezeptoren nach 12 h regeneriert haben. Der Einsatz unterschiedlicher Versuchsmedien - DMEM oder HBSS - hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Sekretionseigenschaften der GLUTag-Zelllinie. Der Einsatz unterschiedlicher Seren beeinflusste zwar das Wachstumsverhalten der GLUTag Charge D94, es waren jedoch keine Unterschiede bei den GLP-1 Sekretionseigenschaften zu verzeichnen (siehe Abb. 3-2 und Tabelle 3-4).

Die persönliche Rücksprache mit Professor D. Drucker (Universität Toronto), der die GLUTag-Zelllinie entwickelte, bestätigte diese Beobachtungen in Bezug auf ein beschleunigtes Wachstum der Zellen in höheren Passagen. Da die GLUTag-Zelllinie nicht von einem einzelnen Zellklon stammt, dominieren nach der Passage x+9 wahrscheinlich schneller wachsende Zellen mit verminderten sekretorischen Leistungen. Außerdem neigen diese Zellen in höheren Passagen verstärkt zum Verklumpen. Dafür sprechen auch unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten zwischen GLUTag-Zellen innerhalb eines Präparats nach GLP-1 Markierung.

Zusammenfassend kann bemerkt werden, daß sich von den drei getesteten GLUTag Zellchargen nur die Charge D94 für weiterführende GLP-1 Sekretionsstudien und für Untersuchungen zu muskarinergen Rezeptoren und Insulinrezeptoren eignete. Diese Charge wies konstante Wachstums- und Sekretionseigenschaften bis zu einer Passagenzahl von x+7 auf und konnte dementsprechend in diesem Bereich eingesetzt werden.

Das Subklonieren der GLUTag Charge D94 wäre ein möglicher Ansatzpunkt zur weiteren Optimierung dieses L-Zellmodells. Das Ziel wäre einen Klon zu selektieren werden, der über viele Passagen konstante Sekretionseigenschaften aufweist.

### **4.1.3 Kultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC)**

Die Primärkultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC) wurde von P. Brubaker (Universität Toronto) zur Untersuchung der GLP-1 Regulation an L-Zellen entwickelt (Brubaker und Vranic, 1987). Es stellte eines der ersten und am umfassendsten charakterisierten in-vitro Modelle zur Bearbeitung dieser Fragestellung dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden FRIC-Kulturen etabliert und für Doppel-fluoreszenzmarkierungen zur Untersuchung der Präsenz von muskarinergen und Insulinrezeptoren auf L-Zellen eingesetzt. Bereits publizierte pharmakologische Daten von FRIC-Kulturen (Brubaker und Vranic, 1987; Brubaker, 1988; Brubaker, 1991; Rocca und Brubaker, 1995) wurden mit den Ergebnissen der GLP-1 Sekretionsstudien an der GLUTag-Zelllinie verglichen, um somit die Eignung der Zelllinie als L-Zellmodell zu überprüfen.

Zur Präparation der Primärkultur wurden Därme fötaler Ratten verwendet, die sich mindestens im 19. Tag ihrer Entwicklung befanden. Untersuchungen zur Ontogenese des fötalen Rattendarmes zeigten, daß die von Proglukagon abgeleiteten Peptide erst ab dem 19. Tag in detektierbaren Mengen im Darm exprimiert werden (Brubaker, 1987). Die Tierzucht hatte dementsprechend zu erfolgen, um den Zeitraum der Paarung möglichst eng eingrenzen zu können.

Um eine optimale Zellausbeute zu erhalten, wurde das Originalprotokoll Brubakers modifiziert (Brubaker und Vranic, 1987). Neben dem Alter der Föten stellten das eingesetzte Enzym Kollagenase und mehrere zusätzliche Waschschriffe die entscheidenden Parameter für eine Präparation mit optimaler Zellanheftung dar.

Die eingesetzte Menge an Kollagenase wurde individuell für eine Charge optimiert. Das Einfügen mehrerer Waschschriffe zu Beginn und gegen Ende der Präparation, führte zu einer erhöhten Zellausbeute und Zellanheftung. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der Reduktion der Erythrozytenzahl - Erythrozyten wirken zytotoxisch und können somit die Zelladhäsion beeinträchtigen. Diese These wurde allerdings nicht experimentell überprüft. Außerdem spielte das eingesetzte FCS eine wichtige Rolle bei der Zellanheftung. Auch hier wurden unterschiedliche FCS-Chargen getestet und ausgewählt.

### **4.1.4 GLP-1-Assay**

Der von Brubaker und Drucker etablierte GLP-1-Assay setzt SEP-PAK C18-Säulen zur reversen Festphasenextraktion von GLP-1 und einen GLP-1 7-36NH<sub>2</sub> RIA zur Quantifizierung des enteroendokrinen Peptids ein.

Für diese Säulen wird eine GLP-1 Wiederfindungsrate zwischen 80 und 97 % angegeben (Brubaker und Vranic, 1987). Sie haben den Nachteil, daß sie nach dem Konditionieren und vor der Probenaufgabe nicht trockenlaufen dürfen, da sonst mit einer Beeinträchtigung der Probenhaftung zu rechnen ist. Außerdem wurden Einzelsäulen eingesetzt, die individuell per Hand mit einer Spritze beschickt wurden. Der zur Quantifizierung von GLP-1 eingesetzte RIA hat den Nachteil, daß er zeitaufwendig ist (drei Tage) und das radioaktiver Abfall anfällt.

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten OASIS-Extraktionssäulen sind mit einem neuartigen HLB Copolymer befüllt. Die Wiederfindungsrate der Einzelsäulen lag bei 90 % und der 96-well Extraktionplatten bei 76 % (Tabelle 3-2). Die Säulen wurden für die vorliegenden Versuche im 96-well Format auf einer Vakuumstation eingesetzt. Somit konnte der Substanzdurchsatz erhöht und der erforderliche Zeitaufwand minimiert werden. Der in der Literatur beschriebene GLP-1 RIA wurde durch einen ELISA ersetzt. Die enzymatische Detektion bietet den Vorteil, daß keine Radioaktivität anfällt. Außerdem kann der Assay innerhalb von drei Stunden durchgeführt werden. Die Eichkurven ließen sich sehr gut reproduzieren (nicht gezeigt).

Da die Proben nach reverser Festphasenextraktion in Isopropanol vorlagen, mußten diese vor der quantitativen Bestimmung erst getrocknet werden. Dies erfolgte mit einem Vakuumkonzentrator. Der Nachteil dieses Verfahrens lag in der teilweise schlechten Löslichkeit des getrockneten Pellets.

Untersuchungen zur Stabilität von GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> zeigten, daß das Peptid problemlos zweimal bei -80 °C ohne Stabilitätsverluste eingefroren werden kann. Außerdem hatte eine Ultraschallbehandlung von bis zu drei Minuten keinen Einfluß auf die Stabilität. Dies war für die vorliegenden Versuche von Bedeutung, da die Proben bei -80 °C gelagert wurden und die Proben vor der Quantifizierung mit Ultraschall behandelt wurden. Beim Erhitzen auf 100 °C für 10 min war allerdings ein Stabilitätsverlust zu beobachten.

Zusammenfassend kann bemerkt werden, daß im Rahmen der methodischen Evaluierung die Voraussetzungen für reproduzierbare Untersuchungen zur GLP-1 Regulation geschaffen wurden. Die GLUTag-Zelllinie wurde etabliert, eine geeignete Zellcharge identifiziert und charakterisiert. Die Primärkultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC) wurde etabliert und die Präparation optimiert. Die Anwendung eines GLP-1 Assays ermöglichte einen hohen Probendurchsatz in kurzer Zeit mit gut reproduzierbaren Ergebnissen.

## 4.2 GLP-1 FLUORESZENZMARKIERUNGEN

GLP-1 und GLI Fluoreszenzmarkierungen spielten bei der Aufklärung der morphologischen Struktur von L-Zellen (Capella et al., 1975; Grimelius et al., 1976; Ravazzola et al., 1979) und deren Verteilung im Organismus (Kauth und Metz, 1987; Eissele et al., 1992; Varndell et al., 1985; Evans und Potten, 1988) eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurden GLP-1 Fluoreszenzmarkierungen an GLUTag-Zellen und fötalen Rattendarmzellen durchgeführt. Außerdem wurde erstmals an GLP-1 immunpositiven Zellen die räumliche Verteilung von Sekretgranula mittels Konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) untersucht. Die CLSM erlaubt das optische Schneiden von Präparaten, indem man schrittweise in die Tiefe (z-Scan) der Objekte hineinscant (Cullander, 1998).

GLP-1 Markierungen an Formalin-fixierten GLUTag-Zellen zeigten, daß alle Zellen GLP-1 immunpositiv waren (Abb. 3-4). Das enteroendokrine Peptid war in Sekretgranula im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. Die Fluoreszenzintensitäten variierten zwischen den einzelnen Zellen, was auf unterschiedliche GLP-1 Expression hinweist, die möglicherweise durch die Präsenz unterschiedlicher Zelltypen erklärt werden kann. Dies würde die These unterstützen, daß die beobachteten Veränderungen der Wachstums- und Sekretionseigenschaften im Laufe der Passagen (siehe Abb. 3-1 und Tabelle 3-4) eventuell auf der Präsenz unterschiedlicher Zelltypen beruhen.

Die an GLP-1 immunpositiven Zellen durchgeführte CLSM veranschaulicht die dreidimensionale Verteilung der Sekretgranula im Zytoplasma (Abb. 3-7 und 3-8). Es war keine Polarisierung der Granula zu beobachten, wie sie in humanen Gewebeschnitten des Ileums und Kolons beschrieben ist (Eissele et al., 1992).

Die an Formalin-fixierten FRIC-Kulturen durchgeführten GLP-1 Markierungen zeigten, daß L-Zellen weniger als 1 % der Gesamtzellpopulation darstellen. Das endokrine Peptid lag in Sekretgranula im Zytoplasma der Zellen vor; L-Zellen, die in einen Zellverband eingebunden waren, zeichneten sich durch die Polarisierung der Granula aus (Abb. 3-10). Bei vereinzelt vorliegenden L-Zellen, also außerhalb eines Zellverbandes, war keine Polarisierung zu beobachten. In diesen Zellen lagen die Granula gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vor (Abb. 3-5). Immunohistochemische Studien am menschlichen Ileum demonstrierten die basolaterale Polarisierung von GLP-1 Granula in L-Zellen (Eissele et al., 1992). In einer Primärkultur angereicherter L-Zellen des Hundedarms wurde ebenfalls eine Repolarisierung der Sekretgranula 48 h nach der Präparation beobachtet (Buchan et al., 1987).

Die dreidimensionale Verteilung von Sekretgranula in GLP-1-immunpositiven L-Zellen wurde mittels CLSM untersucht. Es war eine deutliche Polarisierung der Granula innerhalb



der Zelle zu erkennen (Abb. 3-11 und 3-12), die die Beobachtungen bei den Fluoreszenzaufnahmen bestätigten. Daraus kann geschlossen werden, daß die basolaterale Ausrichtung der GLP-1 Sekretgranula in L-Zellen aus dem Darm fötaler Ratten auch in Kultur erhalten bleibt und durch die Präparation nicht beeinflußt wird. Dies trifft jedoch nicht auf vereinzelte L-Zellen zu, die durch die enzymatische Verdauung völlig aus dem Zellverband gelöst wurden.

GLP-1 Fluoreszenzmarkierungen an FRIC-Kulturen wurden außerdem zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Präparation durchgeführt. Je nach der Dichte der Zellaussaat wurde bereits nach sieben Tagen eine starke Überwucherung der Kultur mit Fibroblasten im lichtmikroskopischen Bild beobachtet. Im fluoreszenzmikroskopischen Bild wurden fast keine L-Zellen mehr beobachtet. Diese Beobachtungen stimmen mit der Aussage von Evans und Potten (1988) überein, nach der sich L-Zellen durch langsame Proliferationsraten auszeichnen. Für weitere Fluoreszenzmarkierungen bedeutete dies, daß die Kulturen nur in den ersten Tagen nach der Präparation für Untersuchungen an L-Zellen geeignet waren.

### **4.3 VERGLEICH DER GLP-1 SEKRETIONSEIGENSCHAFTEN DER GLUTAG-ZELLINIE MIT EINER KULTUR FÖTALER RATTENDARMZELLEN (FRIC)**

Nachdem im Rahmen der methodischen Evaluierung die GLUTag Charge D94 selektiert und in Bezug auf ausgewählte Eigenschaften charakterisiert wurde, demonstrierten weiterführende GLP-1 Sekretionsstudien, daß Regulationsmechanismen vergleichbar zu denen in FRIC-Kulturen vorlagen. Dadurch wurde die Tauglichkeit der enteroendokrinen GLUTag-Zelllinie als L-Zellmodell zur Untersuchung der GLP-1 Regulation überprüft und bestätigt.

#### **4.3.1 Proteinkinase A (PKA)-abhängige Signaltransduktionswege**

Der Adenylatcyklase-Aktivator Forskolin, der direkt, d.h. ohne Interaktion mit exogenen Rezeptoren, am katalytischen Zentrum der Adenylatcyklase angreift und zu einem intrazellulären Anstieg von cAMP führt, steigerte die GLP-1 Sekretion an GLUTag-Zellen bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auf 169 % des Kontrollwerts. Eine maximale Steigerung der Sekretion des enteroendokrinen Peptids auf 209 % wurde bei 10  $\mu\text{M}$  Forskolin beobachtet. Der unspezifische Phosphodiesterase Inhibitor IBMX führte bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer maximalen Steigerung der GLP-1 Sekretion auf 170 %. Die Kombination von Forskolin und IBMX, jeweils in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt, führte zu einem Anstieg der GLP-1 Sekretion auf 409 %.

Untersuchungen an FRIC-Kulturen zeigten, daß eine Konzentration von 100 µM IBMX zu einer Steigerung der GLP-1 Sekretion auf 234 % führte (Brubaker, 1988). Die Kombination von Forskolin und IBMX - jeweils in einer Konzentration von 10 µM - wiesen ein Sekretionsmaximum von 523 % auf (Brubaker, unveröffentlichte Daten, 1997). Die PKA-induzierte GLP-1 Sekretionssteigerung an GLUTag-Zellen ist also mit bereits publizierten Daten aus FRIC-Kulturen vergleichbar.

Drucker und Brubaker (1989) zeigten, daß das zellmembrangängige cAMP-Analogon dbcAMP die Transkription des intestinalen Proglukagon-Gens steigert. Die Aktivierung der PKA wird wahrscheinlich über ein *cAMP-response element* in der 5'-angrenzenden Region des Gens vermittelt (Philippe et al., 1988). In Übereinstimmung mit diesen Befunden demonstrierten Drucker und Brubaker (1989), daß sowohl Forskolin als auch dbcAMP nach 24-stündiger Inkubation zu gesteigerten Proglukagon mRNA Spiegeln (2-3 fach) in FRIC-Kulturen führen. Huang und Brubaker (1995) zeigten außerdem, daß dbcAMP die Biosynthese von GLP-1 nach 24-stündiger Inkubation steigerte.

	Effektor	GLUTag	FRIC	Ref.
PKA	Forskolin	↑	↑	1,2
	IBMX	↑	↑	1,2
	F / I	↑	↑	1,2
PKC	PDBU	↑	↑	1,3
	GIP	↑	↑	2,4
	Bombesin	↑	↑	3,4
	Bethanechol	↑	↑	4
	Oxotremorin-sesquifumarat	↑	?	-

**Tabelle 4-1:** Vergleich der GLP-1 Sekretionseigenschaften der GLUTag-Zelllinie und einer Primärkultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC). (1) Brubaker, 1988 (2) Huang und Brubaker, 1995 (3) Drucker und Brubaker, 1989 (4) Brubaker, 1991.

An GLUTag-Zellen wurden ebenfalls gesteigerte Proglukagon mRNA Spiegel nach 12-stündiger Inkubation mit Forskolin/IMBX (10  $\mu$ M/10  $\mu$ M) beobachtet (Drucker et al., 1994).

In einer Primärkultur angereicherter L-Zellen des Hundedarms steigerte Forskolin ebenfalls die GLP-1 Sekretion (Buchan et al., 1987). Von der STC-1 Zelllinie liegen widersprüchliche Befunde in Bezug auf den PKA-abhängigen Signaltransduktionsweg vor. Abello et al. (1994) berichteten eine Verdopplung der GLP-1 Sekretion nach Inkubation mit 10  $\mu$ M Forskolin, während Brubaker keine Sekretionssteigerung beobachtete (unveröffentlichte Daten, 1997). Dies läßt erneut an der Tauglichkeit der STC-1 Zelllinie als L-Zellmodell zweifeln und unterstreicht die Bedeutung der GLUTag-Zelllinie als Modell zur Untersuchung der GLP-1 Regulation.

#### **4.3.2 Proteinkinase C (PKC)-abhängige Signaltransduktionswege**

Der potente PKC-Aktivator PDBU führte an GLUTag-Zellen bei einer Konzentration von 0,3  $\mu$ M zu einer maximalen Steigerung der GLP-1 Sekretion auf 254 % bezogen auf den Basalwert. Der Phorbolester PMA (1  $\mu$ M) steigerte die GLP-1 Sekretion nach einer Inkubationszeit von 2 h auf 348 % (Drucker et al., 1994). Um den Einfluß der PKC auf die GLP-1 Biosynthese zu untersuchen, wurden GLUTag-Zellen für 24 h mit 1  $\mu$ M PMA inkubiert und anschließend das intrazelluläre GLP-1 bestimmt. Dabei wurde kein Anstieg der GLP-1 Biosynthese beobachtet (Drucker et al., 1994). Nach 24-stündiger Präinkubation mit 1  $\mu$ M PMA wurde im folgenden zwei-stündigen Stimulationsversuch eine *down-regulation* der GLP-1 Sekretion an GLUTag-Zellen beobachtet (Brubaker et al., 1998). Vergleichbare Versuche mit PMA an FRIC-Kulturen zeigten, daß 1  $\mu$ M PMA zu einer Steigerung der GLP-1 Sekretion auf 165 % führte (Brubaker, 1988). Nach einer Inkubationszeit von 24 h war ebenfalls weder eine Steigerung der GLP-1 Biosynthese noch der Proglukagon mRNA Spiegel zu beobachten (Drucker und Brubaker, 1989). An der STC-1 Zelllinie demonstrierten Sekretionsstudien mit 100 nM TPA über einen Zeitraum von zwei Stunden eine Verfünffachung der GLP-1 Sekretion (Abello et al., 1994).

Es darf damit als bestätigt gelten, daß der PKC-abhängige Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle bei der GLP-1 Sekretion, nicht aber der GLP-1 Biosynthese in GLUTag-Zellen spielt. Im Gegensatz dazu hat der PKA-abhängige Signaltransduktionsweg sowohl auf die Sekretion als auch die Biosynthese einen Einfluß. Wie bereits ausführlich dargestellt wurde, stimmen diese Befunde mit Beobachtungen aus anderen Zellmodellen und Spezies überein.

### **4.3.3 Glucose-dependent insulintropic peptide (GIP)**

Neben intrazellulär wirkenden Substanzen wurden auch Substanzen mit oberflächenrezeptorvermitteltem Wirkungsmechanismus getestet, die bei der Regulation der GLP-1 Sekretion von physiologischer Relevanz sind. Dazu zählte unter anderem das duodenale Peptid GIP, das in-vivo als Antwort auf Nahrungsreize sezerniert wird (Pederson et al., 1975; Verdonk et al., 1980). GIP vermittelt neben der glukoseabhängigen Insulinsekretion (Verdonk et al., 1980; Fujimoto et al., 1978; Sarson et al., 1982) die Hemmung der Magensäuresekretion (Pederson und Brown, 1972). Die Klonierung des GIP-Rezeptors zeigte, daß es sich dabei um einen typischen Gs-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben transmembranösen Domänen handelt (Usdin et al., 1993). Es konnte eine direkte Verbindung zwischen GIP und gesteigerter cAMP-Produktion nachgewiesen werden (Usdin et al., 1993).

Bereits 0,003 µM GIP führten an GLUTag-Zellen zu einer Steigerung der GLP-1 Sekretion, die bei 0,1 µM ein Sekretionsmaximum von 301 % erreichte. GLP-1 Sekretionsstudien an FRIC-Kulturen bestätigten diese Beobachtungen - die angegebene Steigerung bei einer GIP-Konzentration von 1 µM lag bei 348 % (Brubaker, 1991) bzw. 256 % (Huang und Brubaker, 1995). Die Unterschiede in der GLP-1 Sekretionssteigerung sind wahrscheinlich in der Variabilität der FRIC-Kulturen begründet.

Untersuchungen am isoliert perfundierten Ileum und Kolon der Ratte bestätigten die sekretionssteigernden Eigenschaften von GIP (Herrman-Rinke et al., 1995; Plaisancie et al., 1994). In-vivo Studien mit GIP ließen Speziesunterschiede bei der Regulation der GLP-1 Sekretion erkennen. Roberge und Brubaker (1993) zeigten, daß GIP die GLP-1 Sekretion in Ratten in-vivo steigert. Dagegen hatte GIP am Menschen keinen Einfluß auf die GLP-1 Freisetzung in zwei unabhängigen Studien (Kreyman et al., 1987, Nauck et al., 1993 a). Ähnliche Speziesunterschiede in der Regulation einer proximaldistalen, enteroendokrinen Schleife wurden zwischen Ratte und Hund beobachtet. Cholecystokinin (CCK) vermittelte in Hunden die Sekretion von PYY (Greeley et al., 1989), dagegen hatte CCK in der Ratte keinen Einfluß auf die PYY Sekretion (Brubaker et al., 1991).

Untersuchungen an FRIC-Kulturen mit dem endokrinen Peptid GIP zeigten, daß nicht nur die GLP-1 Sekretion sondern auch die Biosynthese gesteigert wird (Huang und Brubaker, 1995). Da der GIP-Rezeptor an die PKA gekoppelt ist, wird dies wahrscheinlich über das *cAMP-response element* des Proglukagon-Gens vermittelt.

### **4.3.4 Bombesin**

Als weitere Substanz mit oberflächenrezeptorvermitteltem Wirkmechanismus wurde das Neuropeptid Bombesin an der GLUTag-Zelllinie getestet. Bombesin ist das Analogon in

Amphibien zu humanem GRP (McDonald et al., 1979). Neben den GLP-1 sekretionssteigernden Eigenschaften spielt GRP eine wichtige Rolle bei der Gastrinregulation.

An der GLUTag-Zelllinie führte bereits eine Konzentration von 0,001  $\mu\text{M}$  Bombesin zu einer statistisch signifikanten Steigerung der GLP-1 Sekretion auf 140 %. Die höchste getestete Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  steigerte die Freisetzung des enteroendokrinen Peptids auf 296 %.

Brubaker (1988) berichtete zuerst, daß Bombesin an FRIC-Kulturen keinen Einfluß auf die GLP-1 Sekretion hat. Sie revidierte diese Aussage jedoch in einer späteren Publikation, in der eine Steigerung der GLP-1 Sekretion durch 1 pM Bombesin auf 199 % beschrieben wurde (Brubaker, 1991). Das Bombesin-Analogon GRP steigerte die Sekretion in der gleichen Konzentration auf 159 %. Weitere Untersuchungen demonstrierten, daß 1  $\mu\text{M}$  Bombesin weder die GLP-1 Biosynthese noch Proglukagon mRNA Spiegel in FRIC-Kulturen steigerten (Drucker und Brubaker, 1989). Da der Bombesin-Rezeptor funktionell an die PKC gekoppelt ist, bestätigen diese Beobachtungen, daß die PKC keinen Einfluß auf die Biosynthese von GLP-1 hat.

Weitere Studien an isoliert perfundierten Präparationen des Ileums von Ratte, Hund und Schwein bestätigten die GLP-1 sekretionssteigernden Eigenschaften Bombesins (Plaisancie et al., 1994; Manaka et al., 1994; Holst et al., 1987 a). Auch in-vivo wurde die Bedeutung von Bombesin/GRP in der Regulation der GLP-1 Sekretion in Ratte, Hund und Mensch bestätigt (Sagor et al., 1985; Roberge et al., 1996; Matsuyama et al., 1980; McDonald et al., 1983; Bruzzone et al., 1983).

Das Neuropeptid GRP spielt also im Gegensatz zu GIP auch im Menschen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der GLP-1 Sekretion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, daß Bombesin auch an der GLUTag-Zelllinie eine wichtige Rolle bei der Regulation der GLP-1 Sekretion einnimmt.

Zusammenfassend darf also als bestätigt gelten, daß die GLUTag-Zelllinie ein geeignetes Modell zur Untersuchung der GLP-1 Regulation an L-Zellen darstellt. Im Gegensatz zur STC-1 Zelllinie konnte die Funktionalität aller bekannten Regulationsmechanismen nachgewiesen werden. Einschränkend muß allerdings festgehalten werden, daß die charakterisierte GLUTag Zellcharge D94 nur über eine begrenzte Passagenzahl konstante Wachstums- und Sekretionseigenschaften aufwies.

## 4.4 MUSKARINEGE REGULATION DER GLP-1 SEKRETION

### 4.4.1 Fluoreszenzmarkierungen muskarinerger Rezeptoren

In der vorliegenden Arbeit konnte die Präsenz muskarinerger Rezeptoren und deren direkte funktionelle Verknüpfung mit der GLP-1 Regulation erstmals an der GLUTag-Zelllinie nachgewiesen werden. M35 Fluoreszenzmarkierungen bestätigten die Präsenz muskarinerger Rezeptoren auf der Zelloberfläche, während pharmakologische Studien mit Bethanechol und Atropin die Funktionalität der Rezeptoren belegten. Auf molekularer Ebene konnte cDNA aller fünf bekannten muskarinergen Rezeptorsubtypen mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Doppelfluoreszenzmarkierungen von GLP-1 und muskarinergen Rezeptoren an FRIC-Kulturen ließen keine Kolokalisation in L-Zellen erkennen.

In der Literatur liegen zahlreiche Arbeiten zur Untersuchung der Verteilung muskarinerger Rezeptoren in peripheren Geweben mittels Northern Blots, Immunopräzipitationen, in-situ Hybridisierungen, Bindungsstudien und Immunofluoreszenzmarkierungen vor. Im Ileum wurden hauptsächlich M<sub>2</sub>-Rezeptoren (Dorje et al, 1991; Wall et al., 1991; Giraldo et al., 1987; Michel et al., 1988), aber auch M<sub>1</sub>-, M<sub>3</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren (Dorje et al., 1991; Wall et al., 1991) nachgewiesen. Es liegen jedoch kaum Untersuchungen zur genauen Lokalisation der Rezeptoren in den unterschiedlichen Zelltypen vor. Fluoreszenzmarkierungen bieten gegenüber anderen Methoden den Vorteil, daß die präzise Lokalisation der Rezeptoren ermittelt werden kann. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit M35 Fluoreszenzmarkierungen an GLUTag-Zellen und fötalen Rattendarmzellen durchgeführt. Der Antikörper M35 ist gegen das muskarinerge Rezeptorprotein gerichtet und umfassend für Fluoreszenzanwendungen an Geweben beschrieben (Van der Zee et al., 1989; Van Huizen et al., 1988; Lammerding et al., 1995). Carsi-Gabrenas et al (1997) demonstrierten, daß der monoklonale Antikörper an alle fünf bekannten muskarinergen Rezeptorsubtypen bindet, ohne zwischen ihnen zu diskriminieren. Der Antikörper wurde von Lammerding et al. (1995) zum Nachweis muskarinerger Rezeptoren im Epithelium des Ileums und Kolons von Mausembryonen eingesetzt.

Markierungen an der GLUTag-Zelllinie zeigten, daß alle Zellen M35-immunopositiv waren (Abb. 3-20). Die Markierung war gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt und zeichnete sich durch eine konstante Fluoreszenzintensität aus, die darauf schließen läßt, daß muskarinerge Rezeptoren in GLUTag-Zellen gleichmäßig exprimiert werden. GLP-1/M35 Doppelfluoreszenzmarkierungen an fötalen Rattendarmzellen ließen keine Kolokalisation in L-Zellen erkennen (Abb. 3-25). Jedoch verdeutlichten die Fluoreszenzaufnahmen, daß direkt benachbarte Zellen M35-immunopositiv waren. Da muskarinerge Agonisten die GLP-1

Sekretion an FRIC-Kulturen steigern (Brubaker, 1991), liegt eventuell ein indirekter Stimulationseffekt durch benachbarte Zellen vor. Ähnliche Effekte werden bei der Regulation der Magensäuresekretion durch muskarinerge Rezeptoren beobachtet. Leonard et al. (1991) wiesen auf isolierten Parietalzellen muskarinerge Rezeptoren nach. Im Rahmen der Ulkustherapie hemmt der M<sub>1</sub>-Antagonist Pirenzepin die Säuresekretion in-vivo (Hirschowitz et al., 1983). In-vitro hemmt Pirenzepin die Säuresekretion jedoch kaum. Dies kann durch den Angriff des M<sub>1</sub>-Antagonisten an benachbarten Somatostatin-sezernierenden Zellen in-vivo erklärt werden, die wiederum die Gastrinsekretion beeinflussen. Die Säuresekretion wird in diesem System also sowohl direkt, als auch indirekt über muskarinerge Rezeptoren reguliert. Untersuchungen mit dem muskarinergen Agonisten Bethanechol am isoliert perfundierten Kolon der Ratte (Plaisancie et al., 1994) zeigten, daß Bethanechol erst nach 30 min zu einer maximalen Steigerung der GLP-1 Sekretion führte, was die These einer indirekten Regulation der Sekretion unterstützt.

Um diese Fragestellung weiter zu bearbeiten, wäre es von Interesse fixierte humane Dünndarmschnitte mittels GLP-1/M35 Doppelfluoreszenzmarkierungen auf die direkte Präsenz muskarinergere Rezeptoren auf L-Zellen zu untersuchen. Es ist durchaus möglich, daß Speziesunterschiede bei der muskarinergen Regulation der GLP-1 Sekretion zwischen Ratte und Mensch bestehen. Ähnliche Unterschiede werden bei der Regulation durch GIP beobachtet (Roberge und Brubaker, 1993; Kreymann et al., 1987).

#### **4.4.2 Pharmakologische Studien**

Der Nachweis der funktionellen Verknüpfung muskarinergere Rezeptoren mit der GLP-1 Sekretion an der GLUTag-Zelllinie wurde mit Bethanechol und Atropin erstmals verwirklicht. 500 µM Bethanechol steigerte die Sekretion auf 170 % und 1000 µM auf 181 % des Kontrollwertes. Der Zusatz des unspezifischen cholinergere Antagonisten Atropin inhibierte die GLP-1 Sekretion bei beiden Konzentrationen vollständig. Der potente muskarinerge Agonist Oxotremorinsesquifumarat steigerte die GLP-1 Sekretion bei einer Konzentration von 1 µM auf 191 %.

An der STC-1 Zelllinie steigerte eine Konzentration von 1000 µM Carbachol die GLP-1 Sekretion auf 228 % des Kontrollwertes. Sowohl der unspezifische Antagonist Atropin (1 µM) als auch der M<sub>3</sub>-selektive Antagonist 4-DAMP antagonisierten diesen Effekt vollständig (Abello et al., 1994). Dies läßt auf eine entscheidende Rolle des M<sub>3</sub>-Rezeptors in der Regulation der GLP-1 Sekretion schließen.

An FRIC-Kulturen führte bereits eine Konzentration von 100 µM Bethanechol zu einer Steigerung auf 182 %. Dagegen hatte Carbachol an einer Primärkultur angereicherter L-Zellen

des Hundedarms keinen Effekt auf die GLP-1 Sekretion; allerdings hemmte der cholinerge Agonist die Adrenalin-induzierte GLP-1 Freisetzung (Buchan et al., 1987).

Am isoliert perfundierten Ileum und Kolon der Ratte vermittelten muskarinerge Agonisten sekretionssteigernde Effekte (Dumoulin et al., 1995; Herrmann-Rinke et al., 1995; Plaisancie et al., 1994). Herrmann-Rinke et al. (1995) zeigten, daß die Bethanechol-induzierte GLP-1 Sekretionssteigerung durch Atropin vollständig hemmbar ist.

An Hunden liegen widersprüchliche Aussagen zur muskarinergen Regulation der GLP-1 Sekretion vor. Neben den bereits beschriebenen Effekten Carbachols an einer Primärkultur angereicherter L-Zellen beschreiben Ohneda et al. (1989) in einer in-vivo Studie sekretionssteigernde, durch Atropin hemmbare Effekte Acetylcholins, während Yoshida und Kondo (1980) keine Effekte nachweisen konnten.

Balks et al. (1997) demonstrierten an gesunden menschlichen Probanden die Hemmung der GLP-1 Freisetzung durch Atropin. Man darf also annehmen, daß muskarinerge Rezeptoren auch bei der Regulation der GLP-1 Sekretion am Menschen eine Rolle spielen. Offensichtlich stellt die Spezies Hund in Bezug auf die muskarinerge Regulation des enteroendokrinen Peptids eine Ausnahme dar.

Aufgrund der geringen Intensität des GLP-1 Signals nach Bethanechol-Stimulation an GLUTag-Zellen und der begrenzten für Sekretionsstudien geeigneten Passagenzahlen wurden keine Versuche mit subtypselektiven Antagonisten durchgeführt. Allerdings wäre eine indirekte Charakterisierung muskarinerner Subtypen an GLUTag-Zellen mittels quantitativer fluorimetrischer Bestimmung der Kalziummobilisierung denkbar (Noda et al., 1998). Dazu müßte eine Zellsuspension mit Fura-2 oder einem anderen geeigneten Fluoreszenzfarbstoff markiert und fluorimetrisch bestimmt werden. Die Zugabe eines muskarinergen Agonisten würde zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Mobilisierung intrazellulären Kalziums führen. Die Präinkubation mit subtypspezifischen muskarinergen Antagonisten und anschließender Stimulation durch einen Agonisten würde zu einer Verschiebung der Fluoreszenzintensität führen.



### 4.4.3 Muskarinerge Rezeptorsubtypen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden muskarinergen Rezeptorsubtypen auf molekularer Ebene mittels RT-PCR charakterisiert. Es konnte cDNA aller fünf bekannten Rezeptorsubtypen nachgewiesen werden (Abb. 3-23 und 3-24). Obwohl die eingesetzte RT-PCR keine quantitativen Aussagen erlaubt, scheint es gerechtfertigt, eine geringe Expression des M<sub>5</sub>-Rezeptors anzunehmen, da M<sub>5</sub>-Rezeptor cDNA reamplifiziert werden mußte, um auf dem Agarosegel detektiert werden zu können. Die Präsenz aller fünf Rezeptorsubtypen wirkt

Modell	Spezies	Effektor	GLP-1 Sekretion	Zugabe von Atropin	Ref.
GLUTag	Maus	Bethanechol	↑	↓	1
		Oxotremorinsesquifum.	↑	?	-
STC-1	Maus	Carbachol	↑	↓	2
FRIC	Ratte	Bethanechol	↑	?	3
Angereicherte L-Zellen	Hund	Carbachol	—		4
Isol. Perfund. Ileum	Ratte	Carbachol	↑	?	5
Isol. Perfund. Kolon	Ratte	Bethanechol	↑	↓	6
In-vivo	Hund	ACh	↑	↓	7
		ACh	—		8
	Mensch	Glukose	↑	↓	9

**Tabelle 4-2:** Regulation der GLP-1 Sekretion durch cholinerge Modulatoren an in-vitro und in-vivo Modellen unterschiedlicher Spezies. (1) Brubaker et al., 1998 (2) Abello et al., 1994 (3) Brubaker, 1991 (4) Buchan et al., 1987 (5) Dumoulin et al., 1995 (6) Plaisancie et al., 1994 (7) Ohneda et al., 1989 (8) Yoshida et al., 1980 (9) Balks et al., 1997.

Fragen in Bezug auf mögliche Funktionen in der GLP-1 Regulation auf. Es ist unwahrscheinlich, daß alle Subtypen eine funktionelle Rolle bei der Regulation des enteroendokrinen Peptids spielen. Primär wäre die Frage zu klären, ob alle Rezeptoren tatsächlich exprimiert werden und auf der Zelloberfläche vorhanden sind. Untersuchungen an sekretorischen Zellen zeigten, daß hauptsächlich M<sub>1</sub>- und M<sub>3</sub>-Rezeptoren eine funktionelle Rolle in Sekretionsprozessen wahrnehmen (Dehaye et al., 1988; Kachur et al., 1990; Dai et al., 1991). Abello et al. (1994) berichteten bereits über die Präsenz und funktionelle Verknüpfung von M<sub>3</sub>-Rezeptoren und GLP-1 Sekretion an der STC-1 Zelllinie. In der Regel stimulieren M<sub>1</sub>-, M<sub>3</sub>- und M<sub>5</sub>-Rezeptoren die Phospholipase C (PLC) über die  $\alpha$ -Untereinheit eines G<sub>q/11</sub>-Proteins. Dies führt über die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). Während IP<sub>3</sub> intrazelluläres Calcium freisetzt, kann DAG zur Aktivierung der PKC führen. Dieser Mechanismus ist ausführlich für M<sub>1</sub>- und M<sub>3</sub>-Rezeptoren in sekretorischen Zellen beschrieben (Dehaye et al., 1988; Doughney et al., 1989; Maruyama, 1990; Jones et al., 1991 a).

An der STC-1 Zelllinie führte die Aktivierung von M<sub>3</sub>-Rezeptoren zu einer Mobilisierung zytosolischen Kalziums (Abello et al., 1994). Die Adenylatcyklase (AC)-Aktivität wurde durch Carbachol nicht beeinflusst. Außerdem diskutierten Tang et al. (1997) die Möglichkeit eines alternativen Signaltransduktionsweges für M<sub>3</sub>-Rezeptoren in  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Diese Studien zeigten, daß Carbachol trotz einer Blockade von Ca<sup>2+</sup> und der PKC zu einer unverminderten Freisetzung von Insulin an RINm5F-Zellen führt, was auf einen alternativen Signaltransduktionsweg in diesem System hinweist. Es wäre also von großem Interesse, weitere Untersuchungen zur Signaltransduktion muskarinergere Rezeptoren an der GLUTag-Zelllinie durchzuführen.

M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren hemmen über die Aktivierung von G<sub>i</sub>-Proteinen die AC und öffnen G-Protein gekoppelte K<sup>+</sup>-Kanäle. In der Regel spielen M<sub>2</sub>-Rezeptoren am Herzen, im Gehirn und auf glatten Muskelzellen eine Rolle. Der M<sub>4</sub>-Rezeptor ist unter anderem im Gehirn und auf autonomen Ganglien von Bedeutung. Es liegen jedoch auch Studien vor, in denen der M<sub>4</sub>-Rezeptor zu einer Stimulation der AC führt (Jones et al., 1991 b; Dittman et al., 1994; Onali et al., 1994).

Wie bereits erwähnt ist es fraglich, ob alle fünf detektierten muskarinergen Rezeptorsubtypen eine funktionelle Rolle bei der Regulation der GLP-1 Sekretion spielen. In Anbetracht der bereits diskutierten vorliegenden Literatur zu muskarinergen Rezeptoren erscheint es als wahrscheinlich, daß M<sub>3</sub>-Rezeptoren eine wichtige Funktion bei der GLP-1 Regulation auf L-Zellen zukommt. Auch der M<sub>1</sub>-Rezeptor kommt als potentieller Sekretionsvermittler in Betracht. Trotzdem ist nicht auszuschließen, daß noch weitere Rezeptoren in die Regulation

der GLP-1 Sekretion involviert sind. Bisher wurde angenommen, daß nur der M<sub>2</sub>-Rezeptor am Herzen von physiologischer Relevanz sei (Watson et al., 1983; Peralta et al., 1987). Shi et al. (1999) demonstrierten jedoch kürzlich, daß auch M<sub>3</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren eine funktionelle Rolle am Hundeherzen spielen.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß es sich bei der GLUTag-Zelllinie um eine entartete Zelllinie mit potentiell veränderten Regulationsmechanismen handelt. Drucker et al. (1994) wiesen in GLUTag-Zellen CCK mRNA nach, während CCK-Fluoreszenzmarkierungen ohne Erfolg waren. Diese Befunde weisen auf eine Störung der Translation hin, die eventuell auch bei muskarinergen Rezeptoren von Bedeutung sein könnte.

Um diese Fragestellungen endgültig zu klären, bedarf es weiterführender Untersuchungen an der GLUTag-Zelllinie, die sich mit der Expression muskarinergere Rezeptorsubtypen auf der Zelloberfläche und deren Funktion im Rahmen der GLP-1 Regulation beschäftigen.

#### **4.5 INSULINREZEPTOREN AUF INTESTINALEN L-ZELLEN**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die Präsenz von Insulinrezeptoren auf L-Zellen nachgewiesen werden. Auf GLUTag-Zellen wurden Insulinrezeptoren mittels Immunpräzipitation nach Oberflächenbiotinylierung detektiert. Außerdem wurde die Lokalisation von IRS-1, einem wichtigen Substrat des Insulinrezeptors, in GLUTag-Zellen demonstriert. Darüber hinaus konnte erstmals die Kolokalisation von GLP-1 und IRS-1 in FRIC-Kulturen gezeigt werden. Auf molekularer Ebene wurde Insulinrezeptor cDNA mittels PCR amplifiziert und detektiert. Der Nachweis der funktionellen Verknüpfung von Insulinrezeptoren und GLP-1 Sekretion konnte in dieser Arbeit nicht realisiert werden.

Die Hypothese der potentiellen Rückkopplungshemmung der GLP-1 Sekretion durch Insulin basiert auf zahlreichen Beobachtungen aus Studien, welche die Rolle von GLP-1 und GLP-2 in Typ I und II Diabetikern untersuchten. Die Tatsache, daß bei Typ I und II Diabetikern erhöhte GLP-1 Spiegel vorliegen, spricht für eine wichtige Funktion des Peptidhormons Insulin bei der Regulation der GLP-1 Sekretion (Gutniak et al., 1992; Nauck et al., 1993 b; Brubaker et al., 1989; Matsuyama et al., 1975). Erhöhte GLP-1 Spiegel bei insulindefizienten Ratten bekräftigen diese Vermutung (Kreyman et al., 1988). Matsuyama et al. (1975) berichteten über inhibitorische Effekte von Insulin auf die GLI-Sekretion am Menschen. Außerdem demonstrierten Brubaker und Vranic (1987) inhibitorische Effekte des Peptidhormons auf den intrazellulären GLI-Gehalt an FRIC-Kulturen nach einem Zeitraum von sieben Tagen. Fischer et al. (1997) wiesen an diabetischen Ratten einen direkten funktionellen Zusammenhang zwischen erhöhten GLP-2 Spiegeln und gesteigertem

Darmwachstum nach. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden ebenfalls erhöhte Mengen an GLP-1 im Ileum nachgewiesen, die sich nach Insulingabe normalisierten. Es kann also folgende Hypothese aufgestellt werden: Entfällt die Rückkopplungshemmung durch Insulin, so kommt es zu einer vermehrten Transkription von Proglukagon mRNA und daher zu einer vermehrten Synthese von GLP-1 und GLP-2.

Der Nachweis von Insulinrezeptoren auf GLUTag-Zellen gelang mittels Oberflächenbiotinylierung und anschließender Immunopräzipitation mit einem spezifischen Antikörper (Abb. 3-26). Es liegen bereits zahlreiche Publikationen vor, die die Distribution von Insulinrezeptoren in unterschiedlichen Spezies untersuchten. Autoradiographische Studien an der Maus demonstrierten die Präsenz zahlreicher Insulinbindungsstellen in der Leber, im Darm, im Pankreas und im Gehirn (Watanabe et al., 1992). Gallo-Payet und Hugon (1984) wiesen eine hohe Dichte von Insulinbindungsstellen in einer Primärkultur intestinaler Zellen der Maus nach. Whitcomb et al. (1985) berichteten eine Abnahme der Insulinrezeptordichte vom Duodenum zum Rektum. Untersuchungen an Epithelzellen des Mäusemagens zeigten, daß Insulinrezeptoren nur auf solchen Zellen lokalisiert sind, die in sekretorische Prozesse involviert sind (Watanabe et al., 1992). Bendant et al. (1990) demonstrierten mittels Immunogoldmarkierungen die Präsenz von Insulinrezeptoren auf der basolateralen Membran von Epithelzellen im Ileum der Ratte. Am Menschen wurden kürzlich ebenfalls Insulinrezeptoren auf der basolateralen Seite von Enterozyten nachgewiesen (Menard et al., 1999). Trotz dieser Vielzahl an Daten wurden bisher keine direkten Untersuchungen zu Insulinrezeptoren an L-Zellen, die ebenfalls Epithelzellen darstellen, durchgeführt. Die vorliegenden Ergebnisse an GLUTag-Zellen liefern somit die ersten Hinweise auf die Präsenz des Rezeptors auf intestinalen L-Zellen. Außerdem konnte Insulinrezeptor cDNA mittels PCR in GLUTag-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3-29).

Auf intrazellulärer Ebene wurden an GLUTag-Zellen und FRIC-Kulturen IRS-1 Fluoreszenzmarkierungen durchgeführt. Die Aktivierung des Insulinrezeptors verläuft äußerst komplex. IRS-1, das zuerst in Hepatoma-Zellen nach Insulinstimulation nachgewiesen wurde (Sun et al., 1991), stellt ein wichtiges Substrat des Insulinrezeptors dar. Nach der Bindung Insulins an den Rezeptor wird die Tyrosinkinase der  $\beta$ -Untereinheit aktiviert. Tyrosin-phosphoryliertes IRS-1 dient schließlich als *docking protein* für Proteine mit SH<sub>2</sub>-Domänen, wie z.B. der p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K). Die Bindung führt zur Aktivierung dieser Proteine und ermöglicht die Signalweiterleitung. Die PI3-Kinasekaskade stellt neben der p42-p44MAP-Kinasekaskade einen wichtigen Signaltransduktionsweg nach Rezeptoraktivierung dar.

Der eingesetzte IRS-1 Antikörper wurde bereits umfassend für Fluoreszenzmarkierungen und Western-Blot Anwendungen beschrieben (Sun et al., 1991; Sun et al., 1992; Myers et al., 1992; Levy-Toledano et al., 1994). An GLUTag-Zellen resultierten die IRS-1 Markierungen in einem intensiven Fluoreszenzsignal im Zytoplasma aller Zellen (Abb. 3-27 A). Die Fluoreszenzintensitäten zwischen den Zellen variierten kaum, was auf eine gleichmäßige Expression von IRS-1 hindeutet.

An FRIC-Kulturen belegten GLP-1/IRS-1 Doppelfluoreszenzmarkierungen die Präsenz des Substrats in L-Zellen (Abb. 3-31). Somit kann auf die Lokalisation von Insulinrezeptoren auf L-Zellen geschlossen werden.

Der Nachweis der funktionellen Verknüpfung der Rezeptoren mit der GLP-1 Regulation in GLUTag-Zellen gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht. Einschränkend muß festgehalten werden, daß der Einfluß des Peptidhormons auf die GLP-1 Sekretion nur nach einer Inkubation von zwei Stunden an Zellen mit eingeschränkter Sekretionsleistung experimentell untersucht wurde. Brubaker und Vranic (1987) berichteten, daß Insulin die GLP-1 Freisetzung nach einem Zeitraum von sieben Tagen beeinflusst, während bei Inkubationsversuchen über zwei Stunden keine Effekte verzeichnet werden konnten.

Kahn und Goldfine (1993) unterteilen die physiologischen Effekte des Insulins zeitlich in drei Kategorien: (1) Sofortige Effekte, wie gesteigerter Glukosetransport oder Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Enzymen, die Sekunden nach der Insulinfreisetzung einsetzen. (2) Mittelfristige Effekte, die 5-60 min nach der Freisetzung beobachtet werden. Darunter fällt zum Beispiel die Aktivierung von Genen. Maximale Effekte werden dabei zwischen drei und sechs Stunden verzeichnet. (3) Langfristige Effekte, die erst nach Stunden oder Tagen zum Tragen kommen. Dazu gehören gesteigerte DNA-Synthese, Zellteilung und Zelldifferenzierung. Da an GLUTag-Zellen und FRIC-Kulturen keine kurzfristigen Effekte beobachtet wurden, spielen Insulinrezeptoren möglicherweise bei der mittel- bis langfristigen Regulation der GLP-1 Sekretion eine Rolle. Eine Beeinflussung der Transkription von Proglukagon mRNA wäre denkbar. Dies würde bei gestörter Rückkopplungshemmung zu einer vermehrten Synthese von GLP-1 führen. Allerdings ist auch nicht auszuschließen, daß Insulinrezeptoren eine Funktion bei der Zellproliferation bzw. Differenzierung wahrnehmen.

Um diese Fragestellungen eindeutig zu klären bedarf es weiterführender Untersuchungen, die die funktionelle Verknüpfung im Detail erforschen. Außerdem wäre es von Interesse, die Präsenz von Insulinrezeptoren auf L-Zellen an humanen Darmschnitten mittels GLP-1/IRS-1 oder GLP-1/IR Doppelfluoreszenzmarkierungen zu untersuchen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

### 5.1 ZUSAMMENFASSUNG

*Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) ist ein enteroendokrines Peptid, das nach der Nahrungsaufnahme zur glukoseabhängigen Steigerung der Insulinsekretion aus den B-Zellen des Pankreas führt. GLP-1 ist in L-Zellen im distalen Ileum und Kolon lokalisiert. Die Regulation der GLP-1 Sekretion in intestinalen L-Zellen wurde an der permanenten GLUTag-Zelllinie, die aus intestinalen Tumoren des Dickdarms von *proglucagon-simian virus large T antigen* transgenen Mäusen stammt, und an einer Primärkultur fötaler Rattendarmzellen (FRIC) untersucht.

GLP-1 Immunofluoreszenzmarkierungen (IFM) an GLUTag-Zellen zeigten, daß alle Zellen immunopositiv waren, und daß die GLP-1 Sekretgranula gleichmäßig im Zytoplasma verteilt vorlagen. IFM an FRIC-Kulturen zeigten, daß GLP-1 immunopositive L-Zellen weniger als 1 % der Gesamtzellpopulation darstellen. Mit Hilfe der Konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) konnte die Polarisierung der GLP-1 Sekretgranula in intestinalen L-Zellen nachgewiesen werden.

In Studien zur Regulation der GLP-1 Sekretion an unterschiedlichen Chargen der GLUTag-Zelllinie, wurde die Tauglichkeit der Zelllinie als L-Zellmodell überprüft. Es konnte demonstriert werden, daß Proteinkinase A (PKA)- und Proteinkinase C (PKC)-abhängige Signaltransduktionswege die GLP-1 Sekretion vermitteln. Diese Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten Daten zur Regulation der GLP-1 Sekretion in fötalen Rattendarmzellen überein. Die GLUTag-Zelllinie stellt somit ein L-Zellmodell dar, das sich für regulatorische Untersuchungen eignet. Einschränkend muß allerdings vermerkt werden, daß nur eine der drei getesteten Zellchargen für GLP-1 Sekretionsstudien geeignet war. Diese Charge wies über einen Bereich von zehn Passagen konstante Wachstums- und Sekretionseigenschaften auf, und war somit nur begrenzt einsetzbar.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die muskarinerge Regulation der GLP-1 Sekretion untersucht. IFM an der GLUTag-Zelllinie demonstrierten die Präsenz muskarinerger Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die funktionelle Verknüpfung muskarinerger Rezeptoren mit der GLP-1 Sekretion konnte pharmakologisch an GLUTag-Zellen nachgewiesen werden. Auf molekularer Ebene wurde mRNA aller fünf bekannten muskarinerger Rezeptorsubtypen mit RT-PCR-Experimenten nachgewiesen. Doppel-IFM an fötalen Rattendarmzellen ließen allerdings keine Kolo-kalisation von GLP-1 und muskarinerger Rezeptoren erkennen.

Weiterführende Untersuchungen könnten die Rolle der einzelnen muskarinergen Rezeptorsubtypen in der Regulation der GLP-1 Sekretion klären.

Ein weiteres zentrales Thema der Arbeit waren Untersuchungen zur Präsenz von Insulinrezeptoren auf intestinalen L-Zellen. Auf GLUTag-Zellen wurden Insulinrezeptoren durch Immunopräzipitation nach Oberflächenbiotinylierung detektiert, außerdem wurde Insulinrezeptor cDNA mit der Hilfe von PCR-Experimenten nachgewiesen. *Insulin-receptor substrate-1* (IRS-1), ein wichtiges Substrat des Insulinrezeptors konnte immunocytochemisch im Zytoplasma aller Zellen detektiert werden. Der Nachweis der Kolo-kalisation von GLP-1 und IRS-1 in fötalen Rattendarmzellen gelang mittels Doppel-IFM. Die Rolle von Insulinrezeptoren in der Inhibition der GLP-1 Sekretion könnte im Rahmen weiterführender funktioneller Studien untersucht werden.

### 5.2 SUMMARY

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is an enteroendocrine peptide that mediates the glucose-dependent insulin secretion from pancreatic beta cells. GLP-1 is localized in L cells of the distal ileum and colon. The regulation of GLP-1 secretion was investigated using the permanent GLUTag cell line, which was derived from intestinal endocrine tumors arising in the large bowel in proglucagon-simian virus large T antigen transgenic mice and a primary culture of fetal rat intestinal cells (FRIC).

GLP-1 immunolabeling of GLUTag cells demonstrated that all cells were immunopositive and that GLP-1 granules were evenly distributed throughout the cytoplasm. GLP-1 immunopositive L cells in a culture of FRIC comprised less than 1 % of the total cell population. Confocal laser-scanning microscopy (CLSM) of GLP-1 immunopositive intestinal L cells showed that GLP-1 granules were polarized.

In order to evaluate the suitability of the GLUTag cell line as a L cell model, GLP-1 secretion studies were performed. These studies demonstrated that Protein kinase A- and Protein kinase C-dependent pathways are involved in the regulation of GLP-1 secretion. These findings are in line with previously published data from investigations with FRIC cultures. Therefore, the GLUTag cell line is a suitable L cell model for regulatory studies. However, out of the three tested cell batches only one could be used for GLP-1 secretion experiments. Since this batch was only stable over 10 passages, its application is limited.

Based on these findings, the muscarinic regulation of GLP-1 secretion was investigated. Immunolabeling of GLUTag cells with a non-selective muscarinic receptor antibody demonstrated the presence of muscarinic receptors on the cell surface of all cells. The

functional coupling of muscarinic receptors with GLP-1 secretion in GLUTag cells was shown with bethanechol and atropine. The expression of mRNA of all five muscarinic receptor subtypes was demonstrated by RT-PCR. By performing double-immunolabeling studies no localization of muscarinic receptors on L cells of a culture of FRIC was observed. The role of individual muscarinic receptor subtypes in the regulation of GLP-1 secretion could be further investigated.

The presence of insulin receptors on intestinal L cells was another central theme. By immunoprecipitation of biotinylated surface proteins with a selective antibody the presence of insulin receptors on GLUTag cells was shown. On a molecular level insulin receptor mRNA was detected by RT-PCR. Positive labeling of all GLUTag cells was observed by immunofluorescence microscopy using an insulin receptor substrate-1 (IRS-1) antibody. Double-immunolabeling studies demonstrated the localization of IRS-1 in GLP-1 immunopositive L cells of a culture of FRIC. The role of insulin as a potential inhibitor of GLP-1 secretion needs to be further investigated.



## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abello, J., F. Ye, A. Bosshard, C. Bernard, J.C. Cuber, and J.A. Chayvialle.** Stimulation of glucagon-like peptide-1 secretion by muscarinic agonist in a murine intestinal endocrine cell line. *Endocrinology* 134: 2011-2017, 1994.
- Adrian, T.E., G.H. Ballantyne, W.E. Longo, A.J. Bilchik, Graham, M.D. Basson, R.P. Tierney, and I.M. Modlin.** Deoxycholate is an important releaser of peptide YY and enteroglucagon from the human colon. *Gut* 34: 1219-1224, 1993.
- Ahren, B., H. Larsson, and J.J. Holst.** Effects of glucagon-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82: 473-478, 1997.
- Balks, H.J., J.J. Holst, M. von zur, and G. Brabant.** Rapid oscillations in plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in humans: cholinergic control of GLP-1 secretion via muscarinic receptors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82: 786-790, 1997.
- Barber, D.L., M. Gregor, and A.H. Soll.** Somatostatin and muscarinic inhibition of canine enteric endocrine cells: cellular mechanisms. *American Journal of Physiology* 253: G684-G689, 1987.
- Bell, G.I., R. Sanchez-Pescador, P.J. Laybourn, and R.C. Najarian.** Exon duplication and divergence in the human proglucagon gene. *Nature* 304: 368-371, 1983.
- Bendayan, M., E. Ziv, R. Ben-Sasson, H. Bar-On, and M. Kidron.** Morpho-cytochemical and biochemical evidence for insulin absorption by the rat ileal epithelium. *Diabetologia* 33: 197-204, 1990.
- Bloom, S.R. and J.M. Polak.** The hormonal pattern of intestinal adaptation. A major role for enteroglucagon. *Scandinavian Journal of Gastroenterology - Supplement* 74: 93-103, 1982.
- Brubaker, P.L.** Ontogeny of glucagon-like immunoreactive peptides in rat intestine. *Regulatory Peptides* 17: 319-326, 1987.
- Brubaker, P.L.** Control of glucagon-like immunoreactive peptide secretion from fetal rat intestinal cultures. *Endocrinology* 123: 220-226, 1988.
- Brubaker, P.L.** Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by intestinal regulatory peptides. *Endocrinology* 128: 3175-3182, 1991.

- Brubaker, P.L., D.J. Drucker, S.L. Asa, and G.R. Greenberg.** Regulation of peptide-YY synthesis and secretion in fetal rat intestinal cultures. *Endocrinology* 129: 3351-3358, 1991.
- Brubaker, P.L. and G.R. Greenberg.** Calcitonin gene-related peptide-I preferentially stimulates secretion of somatostatin from intestinal cultures. *Endocrinology* 133: 2833-2837, 1993.
- Brubaker, P.L., J. Schloos, and D.J. Drucker.** Regulation of glucagon-like peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line. *Endocrinology* 139: 4108-4114, 1998.
- Brubaker, P.L., D.C. So, and D.J. Drucker.** Tissue-specific differences in the levels of proglucagon-derived peptides in streptozotocin-induced diabetes. *Endocrinology* 124: 3003-3009, 1989.
- Brubaker, P.L. and M. Vranic.** Fetal rat intestinal cells in monolayer culture: a new in vitro system to study the glucagon-like immunoreactive peptides. *Endocrinology* 120: 1976-1985, 1987.
- Bruzzone, R., G. Tamburrano, A. Lala, M. Mauceri, B. Annibale, C. Severi, L. de Magistris, F. Leonetti, and F.G. Delle.** Effect of bombesin on plasma insulin, pancreatic glucagon, and gut glucagon in man. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 56: 643-647, 1983.
- Buchan, A.M., D.L. Barber, M. Gregor, and A.H. Soll.** Morphologic and physiologic studies of canine ileal enteroglucagon-containing cells in short-term culture. *Gastroenterology* 93: 791-800, 1987.
- Capella, C., E. Solcia, B. Frigerio, and R. Buffa.** Endocrine cells of the human intestine. An ultrastructural study. pp. 43-59. *In: Fujita T, ed Endocrine gut and pancreas.* Amsterdam, Elsevier Scientific, 1976. WK 170 I605e 1975.: 1976.
- Carsi-Gabrenas, J.M., d. Van, E.A. Zee, P.G. Luiten, and L.T. Potter.** Non-selectivity of the monoclonal antibody M35 for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Research Bulletin* 44: 25-31, 1997.
- Creutzfeldt, W. and R. Ebert.** New developments in the incretin concept. [Review] [107 refs]. *Diabetologia* 28: 565-573, 1985.
- Cullander, C.** Light microscopy of living tissue: the state and future of the art. [Review] [35 refs]. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings.* 3: 166-171, 1998.

- Dai, Y.S., I.S. Ambudkar, V.J. Horn, C.K. Yeh, E.E. Kousvelari, S.J. Wall, M. Li, R.P. Yasuda, B.B. Wolfe, and B.J. Baum.** Evidence that M3 muscarinic receptors in rat parotid gland couple to two second messenger systems. *American Journal of Physiology* 261: C1063-C1073, 1991.
- Dehaye, J.P., A. Marino, Y. Soukias, P. Poloczek, J. Winand, and J. Christophe.** Functional characterization of muscarinic receptors in rat parotid acini. *European Journal of Pharmacology* 151: 427-434, 1988.
- Dhanvantari, S., N.G. Seidah, and P.L. Brubaker.** Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucagon. *Molecular Endocrinology* 10: 342-355, 1996.
- Dittman, A.H., J.P. Weber, T.R. Hinds, E.J. Choi, J.C. Migeon, N.M. Nathanson, Storm, and DR.** A novel mechanism for coupling of m4 muscarinic acetylcholine receptors to calmodulin-sensitive adenylyl cyclases: crossover from G protein-coupled inhibition to stimulation. *Biochemistry* 33: 943-951, 1994.
- Dorje, F., A.I. Levey, and M.R. Brann.** Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m1-m5) in rabbit peripheral tissues. *Molecular Pharmacology* 40: 459-462, 1991.
- Doughney, C., P.S. Pedersen, M.A. McPherson, and R.L. Dormer.** Formation of inositol polyphosphates in cultured human sweat duct cells in response to cholinergic stimulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1010: 352-356, 1989.
- Drucker, D.J. and P.L. Brubaker.** Proglucagon gene expression is regulated by a cyclic AMP-dependent pathway in rat intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 3953-3957, 1989.
- Drucker, D.J., T. Jin, S.L. Asa, T.A. Young, and P.L. Brubaker.** Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Molecular Endocrinology* 8: 1646-1655, 1994.
- Drucker, D.J., Y.C. Lee, S.L. Asa, and P.L. Brubaker.** Inhibition of pancreatic glucagon gene expression in mice bearing a subcutaneous glucagon-producing GLUTag transplantable tumor. *Molecular Endocrinology* 6: 2175-2184, 1992.
- Drucker, D.J., J. Philippe, S. Mojsov, W.L. Chick, and J.F. Habener.** Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 3434-3438, 1987.

- Dumoulin, V., T. Dakka, P. Plaisancie, J.A. Chayvialle, and J.C. Cuber.** Regulation of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide, peptide YY, and neurotensin secretion by neurotransmitters and gut hormones in the isolated vascularly perfused rat ileum. *Endocrinology* 136: 5182-5188, 1995.
- Eissele, R., R. Goke, S. Willemer, H.P. Harthus, H. Vermeer, R. Arnold, and B. Goke.** Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European Journal of Clinical Investigation* 22: 283-291, 1992.
- Elliott, R.M., L.M. Morgan, J.A. Tredger, S. Deacon, J. Wright, and V. Marks.** Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *Journal of Endocrinology* 138: 159-166, 1993.
- Evans, G.S. and C.S. Potten.** The distribution of endocrine cells along the mouse intestine: a quantitative immunocytochemical study. *Virchows Archiv B, Cell Pathology Including Molecular Pathology*. 56: 191-199, 1988.
- Fanger, B.O., A.C. Wade, and A.D. Cardin.** Characterization of the murine pancreatic receptor for gastrin releasing peptide and bombesin. *Regulatory Peptides* 32: 241-251, 1991.
- Fehmann, H.C. and J.F. Habener.** Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology* 130: 159-166, 1992.
- Fehmann, H.C., B.J. Hering, M.J. Wolf, H. Brandhorst, Brandhorst, R.G. Bretzel, K. Federlin, and B. Goke.** The effects of glucagon-like peptide-I (GLP-I) on hormone secretion from isolated human pancreatic islets. *Pancreas* 11: 196-200, 1995.
- Fischer, K.D., S. Dhanvantari, D.J. Drucker, and P.L. Brubaker.** Intestinal growth is associated with elevated levels of glucagon-like peptide 2 in diabetic rats. *American Journal of Physiology* 273: E815-E820, 1997.
- Fujimoto, W.Y., J.W. Ensink, F.W. Merchant, R.H. Williams, P.H. Smith, and D.G. Johnson.** Stimulation by gastric inhibitory polypeptide of insulin and glucagon secretion by rat islet cultures. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* 157: 89-93, 1978.
- Gallo-Payet, N. and J.S. Hugon.** Insulin receptors in isolated adult mouse intestinal cells: studies in vivo and in organ culture. *Endocrinology* 114: 1885-1892, 1984.

- Giraldo, E., E. Monferini, H. Ladinsky, and R. Hammer.** Muscarinic receptor heterogeneity in guinea pig intestinal smooth muscle: binding studies with AF-DX 116. *European Journal of Pharmacology* 141: 475-477, 1987.
- Goke, R. and J.M. Conlon.** Receptors for glucagon-like peptide-1(7-36) amide on rat insulinoma-derived cells. *Journal of Endocrinology* 116: 357-362, 1988.
- Greeley, G.H.J., Y.J. Jeng, G. Gomez, T. Hashimoto, F.L. Hill, K. Kern, Kurosky, H.F. Chuo, and J.C. Thompson.** Evidence for regulation of peptide-YY release by the proximal gut. *Endocrinology* 124: 1438-1443, 1989.
- Grimelius, L., C. Capella, R. Buffa, Polak, JM, A.G. Pearse, and E. Solcia.** Cytochemical and ultrastructural differentiation of enteroglucagon and pancreatic-type glucagon cells of the gastrointestinal tract. *Virchows Archiv B. Cell Pathology.* 20: 217-228, 1976.
- Gutniak, M., C. Orskov, J.J. Holst, B. Ahren, and S. Efendic.** Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus [see comments]. *New England Journal of Medicine* 326: 1316-1322, 1992.
- Heinrich, G., P. Gros, and J.F. Habener.** Glucagon gene sequence. Four of six exons encode separate functional domains of rat pre-proglucagon. *Journal of Biological Chemistry* 259: 14082-14087, 1984.
- Herrmann-Rinke, C., A. Voge, M. Hess, and B. Goke.** Regulation of glucagon-like peptide-1 secretion from rat ileum by neurotransmitters and peptides. *Journal of Endocrinology* 147: 25-31, 1995.
- Herrmann, C., R. Goke, G. Richter, H.C. Fehmann, R. Arnold, and B. Goke.** Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56: 117-126, 1995.
- Hirschowitz, B.I., J. Fong, and E. Molina.** Effects of pirenzepine and atropine on vagal and cholinergic gastric secretion and gastrin release and on heart rate in the dog. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 225: 263-268, 1983.
- Holst, J.J., S. Knuhtsen, C. Orskov, T. Skak-Nielsen, S.S. Poulsen, S.L. Jensen, and O.V. Nielsen.** GRP nerves in pig antrum: role of GRP in vagal control of gastrin secretion. *American Journal of Physiology* 253: G643-G649, 1987 a.
- Holst, J.J., C. Orskov, O.V. Nielsen, and T.W. Schwartz.** Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS Letters* 211: 169-174, 1987 b.

- Holst, P.J., J. Christiansen, J.J. Holst, T. Krarup, K. Hint, and Palmgren.** Inhibition of gastric acid secretion by jejunal glucose and its relation to osmolality and glucose load. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 25: 103-111, 1990.
- Huang T.H.J and P.L. Brubaker.** Synthesis and secretion of glucagon-like peptide-1 by fetal rat intestinal cells in culture. *Endocrine* 3: 499-503, 1995.
- Hvidberg, A., M.T. Nielsen, J. Hilsted, C. Orskov, and J.J. Holst.** Effect of glucagon-like peptide-1 (proglucagon 78-107amide) on hepatic glucose production in healthy man. *Metabolism: Clinical & Experimental* 43: 104-108, 1994.
- Jetton, T.L., Y. Liang, C.C. Pettepher, E.C. Zimmerman, F.G. Cox, K. Horvath, F.M. Matschinsky, and M.A. Magnuson.** Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. *Journal of Biological Chemistry* 269: 3641-3654, 1994.
- Jia, X., J.C. Brown, P. Ma, R.A. Pederson, and C.H. McIntosh.** Effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-I-(7-36) on insulin secretion. *American Journal of Physiology* 268: E645-E651, 1995.
- Jones, S.V., O.H. Choi, and M.A. Beaven.** Carbachol induces secretion in a mast cell line (RBL-2H3) transfected with the ml muscarinic receptor gene. *FEBS Letters* 289: 47-50, 1991 a.
- Jones, S.V., C.J. Heilman, and M.R. Brann.** Functional responses of cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Molecular Pharmacology* 40: 242-247, 1991 b.
- Kachur, J.F., B.L. Sturm, T.S. Gaginella, and L. Noronha-Blob.** Regulation of guinea pig ileal electrolyte transport by M3-muscarinic acetylcholine receptors in vitro. *Molecular Pharmacology* 38: 836-840, 1990.
- Kahn, C.R. and A.B. Goldfine.** Molecular determinants of insulin action. [Review] [90 refs]. *Journal of Diabetes & its Complications* 7: 92-105, 1993.
- Kauth, T. and J. Metz.** Immunohistochemical localization of glucagon-like peptide 1. Use of poly- and monoclonal antibodies. *Histochemistry* 86: 509-515, 1987.
- Kolligs, F., H.C. Fehmann, R. Goke, and B. Goke.** Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide 1 receptor antagonist exendin (9-39) amide. *Diabetes* 44: 16-19, 1995.
- Kraenzlin, M.E., J.L. Ch'ng, P.K. Mulderry, M.A. Ghatei, and S.R. Bloom.** Infusion of a novel peptide, calcitonin gene-related peptide (CGRP) in man. Pharmacokinetics and

- effects on gastric acid secretion and on gastrointestinal hormones. *Regulatory Peptides* 10: 189-197, 1985.
- Kreymann, B., G. Williams, M.A. Ghatei, and S.R. Bloom.** Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* 2: 1300-1304, 1987.
- Kreymann, B., Y. Yiangou, S. Kanse, G. Williams, M.A. Ghatei, and S.R. Bloom.** Isolation and characterisation of GLP-1 7-36 amide from rat intestine. Elevated levels in diabetic rats. *FEBS Letters* 242: 167-170, 1988.
- Lammerding-Koppel, M., A. Greiner-Schroder, and U. Drews.** Muscarinic receptors in the prenatal mouse embryo. Comparison of M35-immunohistochemistry with [3H]quinuclidinyl benzylate autoradiography. *Histochemistry & Cell Biology* 103: 301-310, 1995.
- Leonard, A., P. Cuq, R. Magous, and J.P. Bali.** M3-subtype muscarinic receptor that controls intracellular calcium release and inositol phosphate accumulation in gastric parietal cells. *Biochemical Pharmacology* 42: 839-845, 1991.
- Levy-Toledano, R., M. Taouis, D.H. Blaettler, P. Gorden, and S.I. Taylor.** Insulin-induced activation of phosphatidyl inositol 3-kinase. Demonstration that the p85 subunit binds directly to the COOH terminus of the insulin receptor in intact cells. *Journal of Biological Chemistry* 269: 31178-31182, 1994.
- Lickley, H.L., F.W. Kemmer, D.E. Gray, N. Kovacevic, T.W. Hatton, G. Perez, and Vranic.** Chromatographic pattern of extrapancreatic glucagon and glucagon-like immunoreactivity before and during stimulation by epinephrine and participation of glucagon in epinephrine-induced hepatic glucose overproduction. *Surgery* 90: 186-194, 1981.
- Manaka, H., Sugiyama, K., Ohnuma, H., Daimon, M., Suda, K., Fukase, N., Takahashi, H., Yamatani, K., Tominaga, M., and Sasaki, H.** Neuropeptides control truncated glucagon-like peptide-1 (tGLP-1) secretion from the ileum. 26A. Glucagon and Related Peptides Symposium, Osaka. 1994.
- Maruyama, Y.** Inhibitory effects of arachidonic acid on muscarinic current response in single pancreatic acinar cells of rats. *Journal of Physiology* 430: 471-482, 1990.
- Matsuyama, T., W.H. Hoffman, J.C. Dunbar, N.L. Foa, and P.P. Foa.** Glucose, insulin, pancreatic glucagon and glucagon-like immunoreactive materials in the plasma of normal and diabetic children. Effect of the initial insulin treatment. *Hormone & Metabolic Research* 7: 452-456, 1975.

- Matsuyama, T., M. Namba, K. Nonaka, S. Tarui, R. Tanaka, and K. Shima.** Decrease in blood glucose and release of gut glucagon-like immunoreactive materials by bombesin infusion in the dog. *Endocrinologia Japonica* 27 Suppl 1: 115-119, 1980.
- McDonald, T.J., M.A. Ghatei, S.R. Bloom, Adrian, TE, T. Mochizuki, C. Yanaihara, and N. Yanaihara.** Dose-response comparisons of canine plasma gastroenteropancreatic hormone responses to bombesin and the porcine gastrin-releasing peptide (GRP). *Regulatory Peptides* 5: 125-137, 1983.
- McDonald, T.J., H. Jornvall, G. Nilsson, M. Vagne, M. Ghatei, S.R. Bloom, and Mutt.** Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 90: 227-233, 1979.
- Menard, D., L. Corriveau, and J.F. Beaulieu.** Insulin modulates cellular proliferation in developing human jejunum and colon. *Biology of the Neonate* 75: 143-151, 1999.
- Michel, A.D. and R.L. Whiting.** Methoctramine reveals heterogeneity of M2 muscarinic receptors in longitudinal ileal smooth muscle membranes. *European Journal of Pharmacology* 145: 305-311, 1988.
- Mojsov, S., G. Heinrich, I.B. Wilson, M. Ravazzola, L. Orci, and J.F. Habener.** Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *Journal of Biological Chemistry* 261: 11880-11889, 1986.
- Mojsov, S., M.G. Kopczynski, and J.F. Habener.** Both amidated and nonamidated forms of glucagon-like peptide I are synthesized in the rat intestine and the pancreas. *Journal of Biological Chemistry* 265: 8001-8008, 1990.
- Mojsov, S., G.C. Weir, and J.F. Habener.** Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *Journal of Clinical Investigation* 79: 616-619, 1987.
- Myers, M.G.J., J.M. Backer, X.J. Sun, S. Shoelson, P. Hu, J. Schlessinger, M. Yoakim, B. Schaffhausen, and M.F. White.** IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 10350-10354, 1992.
- Nauck, M.A., E. Bartels, C. Orskov, R. Ebert, and W. Creutzfeldt.** Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and



glucose concentrations. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 76: 912-917, 1993 a.

**Nauck, M.A., M.M. Heimesaat, C. Orskov, J.J. Holst, R. Ebert, and W. Creutzfeldt.** Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation* 91: 301-307, 1993 b.

**Nauck, M.A., D. Wollschlager, J. Werner, J.J. Holst, C. Orskov, W. Creutzfeldt, and B. Willms.** Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia* 39: 1546-1553, 1996.

**Noda, S., M. Lammerding-Koppel, G. Oettling, and U. Drews.** Characterization of muscarinic receptors in the human melanoma cell line SK-Mel-28 via calcium mobilization. *Cancer Letters* 133: 107-114, 1998.

**Ohneda, A., I. Sasaki, H. Naito, M. Toda, M. Ohneda, and F. Koizumi.** Response of gut glucagon-like immunoreactivity to hypoglycemia in dogs. *American Journal of Physiology* 256: E431-E438, 1989.

**Ohneda, A., H. Takahashi, and Y. Maruyama.** Response of plasma glicentin to fat ingestion in piglets. *Diabetes Research & Clinical Practice* 3: 103-109, 1987.

**Onali, P., A.J. Aasen, and M.C. Olanas.** Antagonism by (R)- and (S)-trihexyphenidyl of muscarinic stimulation of adenylyl cyclase in rat olfactory bulb and inhibition in striatum and heart. *British Journal of Pharmacology* 113: 775-780, 1994.

**Orskov, C., J.J. Holst, S. Knuhtsen, F.G. Baldissera, Poulsen, SS, and O.V. Nielsen.** Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas. *Endocrinology* 119: 1467-1475, 1986.

**Orskov, C., J.J. Holst, S.S. Poulsen, and P. Kirkegaard.** Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man. *Diabetologia* 30: 874-881, 1987.

**Pederson, R.A. and J.C. Brown.** Inhibition of histamine-, pentagastrin-, and insulin-stimulated canine gastric secretion by pure "gastric inhibitory polypeptide". *Gastroenterology* 62: 393-400, 1972.

**Pederson, R.A., H.E. Schubert, and J.C. Brown.** The insulinotropic action of gastric inhibitory polypeptide. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 53: 217-223, 1975.

- Peralta, E.G., A. Ashkenazi, J.W. Winslow, D.H. Smith, J. Ramachandran, and D.J. Capon.** Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO Journal* 6: 3923-3929, 1987.
- Perley, M.J. and D.M. Kipnis.** Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *Journal of Clinical Investigation* 46: 1954-1962, 1967.
- Philippe, J., D.J. Drucker, W. Knepel, L. Jepeal, Z. Misulovin, and J.F. Habener.** Alpha-cell-specific expression of the glucagon gene is conferred to the glucagon promoter element by the interactions of DNA-binding proteins. *Molecular & Cellular Biology* 8: 4877-4888, 1988.
- Plaisancie, P., C. Bernard, J.A. Chayvialle, and J.C. Cuber.** Regulation of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide secretion by intestinal neurotransmitters and hormones in the isolated vascularly perfused rat colon. *Endocrinology* 135: 2398-2403, 1994.
- Potten, C.S. and M. Loeffler.** Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. [Review] [83 refs]. *Development* 110: 1001-1020, 1990.
- Rachman, J., F.M. Gribble, B.A. Barrow, J.C. Levy, K.D. Buchanan, and R.C. Turner.** Normalization of insulin responses to glucose by overnight infusion of glucagon-like peptide 1 (7-36) amide in patients with NIDDM. *Diabetes* 45: 1524-1530, 1996.
- Ravazzola, M., A. Siperstein, A.J. Moody, F. Sundby, H. Jacobsen, and L. Orci.** Glicentin immunoreactive cells: their relationship to glucagon-producing cells. *Endocrinology* 105: 499-508, 1979.
- Ritzel, R., C. Orskov, J.J. Holst, and M.A. Nauck.** Pharmacokinetic, insulinotropic, and glucagonostatic properties of GLP-1 [7-36 amide] after subcutaneous injection in healthy volunteers. Dose-response-relationships. *Diabetologia* 38: 720-725, 1995.
- Roberge, J.N. and P.L. Brubaker.** Secretion of proglucagon-derived peptides in response to intestinal luminal nutrients. *Endocrinology* 128: 3169-3174, 1991.
- Roberge, J.N. and P.L. Brubaker.** Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology* 133: 233-240, 1993.

- Roberge, J.N., K.A. Gronau, and P.L. Brubaker.** Gastrin-releasing peptide is a novel mediator of proximal nutrient-induced proglucagon-derived peptide secretion from the distal gut. *Endocrinology* 137: 2383-2388, 1996.
- Rocca, A.S. and P.L. Brubaker.** Stereospecific effects of fatty acids on proglucagon-derived peptide secretion in fetal rat intestinal cultures. *Endocrinology* 136: 5593-5599, 1995.
- Rothenberg, M.E., C.D. Eilertson, K. Klein, Y. Zhou, Lindberg, J.K. McDonald, R.B. Mackin, and B.D. Noe.** Processing of mouse proglucagon by recombinant prohormone convertase 1 and immunopurified prohormone convertase 2 in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 270: 10136-10146, 1995.
- Sagor, G.R., M.A. Ghatei, D.J. O'Shaughnessy, M.Y. Al-Mukhtar, N.A. Wright, and S.R. Bloom.** Influence of somatostatin and bombesin on plasma enteroglucagon and cell proliferation after intestinal resection in the rat. *Gut* 26: 89-94, 1985.
- Sakurai, H., R.E. Dobbs, and R.H. Unger.** The effect of somatostatin on the response of GLI to the intraduodenal administration of glucose, protein, and fat. *Diabetologia* 11: 427-430, 1975.
- Sarson, D.L., S.M. Wood, D. Holder, and S.R. Bloom.** The effect of glucose-dependent insulinotropic polypeptide infused at physiological concentrations on the release of insulin in man. *Diabetologia* 22: 33-36, 1982.
- Shi, H., H. Wang, and Z. Wang.** Identification and characterization of multiple subtypes of muscarinic acetylcholine receptors and their physiological functions in canine hearts. *Molecular Pharmacology* 55: 497-507, 1999.
- Sun, X.J., M. Miralpeix, M.G.J. Myers, E.M. Glasheen, Backer, JM, C.R. Kahn, and M.F. White.** Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. *Journal of Biological Chemistry* 267: 22662-22672, 1992.
- Sun, X.J., P. Rothenberg, C.R. Kahn, J.M. Backer, E. Araki, P.A. Wilden, D.A. Cahill, B.J. Goldstein, and M.F. White.** Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77, 1991.
- Tang, S.H. and G.W. Sharp.** Identification of muscarinic receptor subtypes in RINm5F cells by means of polymerase chain reaction, subcloning, and DNA sequencing. *Diabetes* 46: 1419-1423, 1997.
- Todd, J.F., J.P. Wilding, C.M. Edwards, F.A. Khan, M.A. Ghatei, and S.R. Bloom.** Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): a trial of treatment in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation* 27: 533-536, 1997.

- Turton, M.D., D. O'Shea, I. Gunn, S.A. Beak, C.M. Edwards, K. Meeran, S.J. Choi, G.M. Taylor, M.M. Heath, P.D. Lambert, J.P. Wilding, D.M. Smith, M.A. Ghatel, J. Herbert, and S.R. Bloom.** A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379: 69-72, 1996.
- Usdin, T.B., E. Mezey, D.C. Button, M.J. Brownstein, and T.I. Bonner.** Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133: 2861-2870, 1993.
- Valverde, I., M. Morales, F. Clemente, M.I. Lopez-Delgado, E. Delgado, A. Perea, and M.L. Villanueva-Penacarrillo.** Glukagon-like peptide 1: a potent glycogenic hormone. *FEBS Letters* 349: 313-316, 1994.
- Van der Zee, E.A., T. Matsuyama, A.D. Strosberg, J. Traber, and P.G. Luiten.** Demonstration of muscarinic acetylcholine receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain and upper brainstem. *Histochemistry* 92: 475-485, 1989.
- van Huizen, F., A.D. Strosberg, and M.S. Cynader.** Cellular and subcellular localisation of muscarinic acetylcholine receptors during postnatal development of cat visual cortex using immunocytochemical procedures. *Brain Research Developmental Brain Research*. 44: 296-301, 1988.
- Varndell, I.M., A.E. Bishop, K.L. Sikri, L.O. Uttenthal, S.R. Bloom, and J.M. Polak.** Localization of glucagon-like peptide (GLP) immunoreactants in human gut and pancreas using light and electron microscopic immunocytochemistry. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 33: 1080-1086, 1985.
- Verdonk, C.A., R.A. Rizza, R.L. Nelson, V.L. Go, J.E. Gerich, and F.J. Service.** Interaction of fat-stimulated gastric inhibitory polypeptide on pancreatic alpha and beta cell function. *Journal of Clinical Investigation* 65: 1119-1125, 1980.
- Viollet, C., G. Prevost, E. Maubert, A. Faivre-Bauman, R. Gardette, C. Kordon, C. Loudes, A. Slama, and J. Epelbaum.** Molecular pharmacology of somatostatin receptors. [Review] [49 refs]. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 9: 107-113, 1995.
- Wall, S.J., R.P. Yasuda, M. Li, and B.B. Wolfe.** Development of an antiserum against m3 muscarinic receptors: distribution of m3 receptors in rat tissues and clonal cell lines. *Molecular Pharmacology* 40: 783-789, 1991.

- Wang, Z., R.M. Wang, A.A. Owji, D.M. Smith, M.A. Ghatel, and S.R. Bloom.** Glucagon-like peptide-1 is a physiological incretin in rat [see comments]. *Journal of Clinical Investigation* 95: 417-421, 1995.
- Watanabe, M., Y. Hirose, M. Sugimoto, M. Nakanishi, H. Watanabe, and M. Shimada.** The distribution of tissue insulin receptors in the mouse by whole-body autoradiography. *Journal of Receptor Research* 12: 13-37, 1992.
- Watson, M., H.I. Yamamura, and W.R. Roeske.** A unique regulatory profile and regional distribution of [3H]pirenzepine binding in the rat provide evidence for distinct M1 and M2 muscarinic receptor subtypes. *Life Sciences* 32: 3001-3011, 1983.
- Whitcomb, D.C., T.M. O'Dorisio, S. Cataland, M.A. Shetzline, and M.T. Nishikawara.** Identification of tissue insulin receptors: use of a unique in vivo radioreceptor assay. *American Journal of Physiology* 249: E561-E567, 1985.
- Yoshida, T. and M. Kondo.** Effect of acetylcholine on the secretion of gut glucagon immunoreactivity and gut glucagon-like immunoreactivity in pancreatectomized dogs. *Endocrinologia Japonica* 27: 33-38, 1980.

## 7. DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. H.-J. Mest danke ich sehr herzlich für das Überlassen des Themas der vorliegenden Arbeit und die fachliche sowie persönliche Unterstützung, die ein kreatives wissenschaftliches Arbeiten ermöglichte.

Herrn Professor Dr. H. Marquardt danke ich für die fachliche Überarbeitung der Arbeit und insbesondere für das freundliche Angebot, die Rohfassung der Arbeit während seines Urlaubs zu korrigieren.

Ich danke Herrn Dr. J. Schloos der Teile der vorliegenden Arbeit betreut hat und mir in zahlreichen intensiven Diskussionen beratend zur Seite stand.

Frau Dr. S. Sewing möchte ich meinen Dank für die Betreuung des molekularbiologischen Teils der Arbeit aussprechen.

Herrn PD P. Lemansky danke ich für die Einführung in die Methoden der Immunzytochemie und Proteinchemie, die eine wichtige Basis der Arbeit darstellen.

Bei Frau S. Wawro möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Frau Dr. G. Vielhaber der Beiersdorf AG gilt mein besonderer Dank für Ihre uneigennützig Unterstützung.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der Abteilung Pharmakologie der Lilly Forschung GmbH für die freundliche Aufnahme und kollegiale Zusammenarbeit. Bei Herrn Dr. A. Raap möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung der Poster bedanken.

I would especially like to thank Rowena for her patience and loving support.

## 8 CURRICULUM VITAE

Geburtsdatum 13. Juli 1970  
Geburtsort Tübingen  
Nationalität Deutsch

### AUSBILDUNG

1976-89 Grundschole und Gymnasium in Eberbach  
Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife  
1989-90 Wehrdienst in einer Fördergruppe für Leistungssport  
1990-96 Studium der Pharmazie  
an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
1992 1. Staatsexamen  
1993-94 Stipendium an der University of Washington in Seattle, USA  
Thema: 'Design of HIV vaccines'  
1996 2. Staatsexamen  
1997 3. Staatsexamen

### BERUFLICHER WERDEGANG

1992 - 93 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Biologie  
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
1996 - 97 Praktisches Jahr. 6 Monate in der Greifen-Apotheke, Kirchzarten  
6 Monate in der Apotheke am Markt, Eberbach  
1997 Apotheker in der Grünen Apotheke, Berlin  
08/97 - 09/99 Promotion im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

### SPRACHEN

Englisch - Französisch - Chinesisch (Mandarin)

### PUBLIKATIONEN

Dong, P., Brunn, C., Ho, R.J. Cytokines as vaccine adjuvants. Current status and potential applications. *Pharm. Biotechnol.* 6: 625-43. 1995.

Brunn, C., Schloos, J., Sewing, S., Lemansky, P., Mest, H.-J. Characterization of muscarinic receptor subtypes in the GLUTag mouse enteroendocrine cell line. *Diabetologia* 42 (Suppl. 1), A 199, No. 746, 1999.

- Brunn, C., Schloos, C., Sewing, S., Lemansky, P., Mest, H.-J. Insulin as a feedback regulator of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) release? *Br. J. Pharmacol. (Suppl.)*, 1999, im Druck.
- Brunn, C., Schloos, J., Sewing, S., Lemansky, P., Wawro, S., Mest, H.-J. Regulation of GLP-1 secretion by muscarinic receptors in the GLUTag enteroendocrine cell line. eingereicht bei *Journal of Cell Science*, 1999.



Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die vorliegende Dissertation habe ich noch keiner anderen Universität vorgelegt, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

*Carste Bün*

Hamburg, den 3.8.1999