

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.