

**Wirkmechanismus verschiedener Imidazoline bezüglich
ihrer insulinfreisetzenden Eigenschaften in einer Beta-
Zelllinie.**

Aus der Abteilung für Toxikologie
Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg
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
Mathis Scheltdorf
aus Leonberg

Hamburg, 2001



1. Gutachter: Prof. Dr. H. Marquardt

2. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Mest

Mündliche Prüfungen: November 2001

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Diabetes mellitus	1
1.2. Therapeutika	1
1.3. Die Beta-Zelle	2
1.3.1. Signalwege der Insulinfreisetzung	2
1.3.2. Insulin sezernierende Zelllinien INS 1 und MIN 6	3
1.4. Der K_{ATP} Kanal	5
1.4.1. Die molekulare Struktur des K_{ATP} Kanals	5
1.4.2. Imidazoline und der K_{ATP} Kanal	6
1.4.3. Imidazoline und K_{ATP} Kanal-unabhängige Wege der Insulinfreisetzung	7
1.4.4. Imidazoline mit insulinsekretionshemmender Wirkung	8
1.4.5. Der K_{ATP} Kanal als zentraler, gemeinsamer Angriffsort von Imidazolin	9
1.5. Neue Imidazoline	9
1.6. Imidazolinbindungsstellen	10
1.7. Alpha Rezeptoren der Beta-Zelle	13
1.8. Calcium und Insulinfreisetzung	14
1.9. Glukose und Insulinfreisetzung	15
1.10. Aufgabenstellung	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Zelllinien	17
2.1.1. MIN 6 Zelllinie	17
2.1.2. INS 1 Zelllinie	18
2.1.3. HEK 293 Zelllinie	19
2.2. Insulinfreisetzungsversuche mit statischer Inkubation	19
2.3. Radio Immuno Assay (=RIA)	20
2.4. Bisoxonol Membranpotenzialsmessung	21
2.5. Confokale Laserscanning Mikroskopie (=CLSM)	23
2.5.1. Funktionsweise eines CLSM	23

2.5.2. Durchführung der CLSM	25
2.6. Aufnahme von Fluoreszenzspektren	26
2.7. MTS Test auf Zytotoxizität und Zellproliferation	27
2.8. Indirekte Messung von cAMP Konzentrationsänderungen	28
2.9. Messung der Phosphodiesteraseaktivität	29
2.10. Statistik	30
2.11. Chemikalien	30
2.12. Strukturformeln	31
3. Ergebnisse	34
3.1. Insulinfreisetzungsversuche	34
3.1.1. Glukose-abhängige Insulinfreisetzung durch Imidazoline	34
3.1.2. Glukose-unabhängige Insulinfreisetzung durch Sulphonylharnstoffe	35
3.1.3. Kombinierte Applikation von Imidazolinen	35
3.1.4. Insulinfreisetzung durch verschiedene Imidazoline und Guanidinderivate	37
3.1.5. Desensitisierungsversuche mit Efaroxan und BL 11778	39
3.1.6. Abhängigkeit der Imidazolinwirkung von der Ca ²⁺ Konzentration	39
3.1.7. Additive Insulinfreisetzung zur KCl-Stimulation durch BL 11771	41
3.1.8. Insulinfreisetzungskinetik von Imidazolinen und Glukose	42
3.1.9. Präinkubationsversuche mit Imidazolinen	44
3.1.10. Einfluß von alpha-2 Agonisten auf die Insulinfreisetzung	46
3.1.11. Insulinfreisetzungsversuche mit INS 1 Zellen	49
3.2. Depolarisationsversuche mit der Bisoxonol-Methode	51
3.2.1. Untersuchung der depolarisierenden Aktivität von Naphthol- und Indolimidazolinen in MIN 6 Zellen	51
3.2.2. Untersuchung der depolarisierenden Aktivität von Sulphonylharnstoffen in MIN 6 Zellen	54
3.2.3. Einflüsse von unselektiven alpha- und selektiven alpha-2 Agonisten auf das MIN 6 Zellpotential	56

3.2.4. Einflüsse von unselektiven alpha- und selektiven alpha-2 Agonisten auf das MIN 6 Zellpotential nach Pertussis Toxin Präinkubation	58
3.2.5. Übersicht über elektrophysiologische Wirkungen von Imidazolinen	59
3.3. Fluoreszenzmessungen in MIN 6 Zellen	60
3.3.1. Fluoreszenzspektren der Naphtholimidazoline	60
3.3.2. Confokale Laserscanning Mikroskopie (=CLSM) von MIN 6 Zellen mit den Imidazolinen BL 11771 und BL 11778	61
3.3.3. CLSM von MIN 6 Zellen mit Imidazolinen und Newport Green	62
3.3.4. CLSM von Insulin-Immunfluoreszenz und Imidazolinen	64
3.3.5. CLSM von MIN 6 Zellen und fluoreszenzmarkiertem Glibenclamid	65
3.3.6. Fluoreszenzkinetik von BL 11778 in Abhängigkeit der Glukosekonzentration	67
3.3.7. Fluoreszenzkinetik von BL 11778 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer	68
3.4. Untersuchungen zur Beeinflussung der cAMP Konzentrationen durch Naphthol- und Indolimidazoline in MIN 6 Zellen	70
3.4.1. Messung der Phosphodiesteraseaktivität	70
3.4.2. Messung von cAMP Konzentrationsänderungen in HEK 293 Zellen	72
3.5. Untersuchungen zur Toxizität verschiedener Imidazoline in MIN 6 Zellen	73
3.5.1. Prüfung verschiedener Imidazoline auf Zytotoxizität durch den MTS-Test	74
4. Diskussion	76
4.1. Insulinfreisetzung durch Imidazoline	77
4.1.1. Imidazoline, die zu einer Erhöhung der Insulinfreisetzung führen	77
4.1.2. Imidazoline, die zu einer Erniedrigung der Insulinfreisetzung führen	81
4.2. Untersuchungen der Imidazolinwirkungen auf das Membranpotential	82
4.2.1. Untersuchungen der insulinfreisetzenden Imidazoline auf Membranpotentialänderungen	82
4.2.2. Untersuchung der insulinfreisetzungshemmenden Imidazoline auf Membranpotentialänderungen	86

4.3. Untersuchungen der Imidazolinbindungsorte mittels CLSM und Fluoreszenzmarkierung	88
4.4. Untersuchungen zur Bindungskinetik von BL 11778	94
4.5. Beeinflussung der cAMP-Spiegel durch Imidazoline	96
4.6. Untersuchungen zur Toxizität der Imidazoline	97
5. Zusammenfassung/Summary	99
6. Literaturverzeichnis	102
7. Danksagung	124
8. Curriculum vitae	125

Abkürzungsverzeichnis

Ach	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumine
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
CDS	Clonidine Displacing Substance
CIP	Calcineurin Inhibitory Peptide
CLSM	Confocal Laserscanning Microscopy
CREB	cAMP Response Element Binding
CaM Kinase II	Calcium-Calmodulin abhängige Protein Kinase II
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EBSS	Earle`s Balanced Salt Solution
FCS	Fetal Calf Serum
GDP	Guanosindiphosphat
GIP	Glucose-dependent Insulinotropic Peptide
GLP-1	Glucagon-Like Peptide-1
GTP	Guanosintriphosphat
IP3	Inositoltriphosphat
IBS	Imidazoline Binding Site
K _{ATP}	ATP-abhängiger Kaliumkanal
Kir	inwardly rectifying potassium channel
KRBH	Krebs Ringer Buffer Hepes
MIN	Mouse Insulinoma

MDR	Multi Drug Resistance
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]
NBD	Nucleotide Binding Domaine
NPG	Newport Green
PBS	Phosphate Buffer Saline
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTX	Pertussis Toxin
RIA	Radioimmunoassay
SEM	Standard Error of Means/ Standardabweichung des Mittelwertes
SLO	Streptolysin-O
SPA	Scintillation Proximity Assay
SUR	Sulphonylurea Receptor
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
ZDF	Zucker Diabetic Fatty

1. Einleitung

1.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist die weltweit häufigste Stoffwechselerkrankung. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Formen des Diabetes mellitus. Beim Typ I Diabetes, auch insulinabhängiger Diabetes mellitus genannt, kommt es zum Beta-Zelluntergang in den Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse und damit zum Mangel an Insulin. Diese Diabetesform manifestiert sich meist im Kindes- und Jugendalter und wird deshalb auch als juveniler Diabetes mellitus bezeichnet. Die genauen Ursachen dieser Erkrankung sind noch unklar. Beim Typ II Diabetes, auch insulinunabhängiger Diabetes mellitus genannt, sind im Gegensatz zum Typ I noch insulinproduzierende Beta-Zellen vorhanden. Die unterschiedlichen Ausprägungen dieses relativen Insulinmangels haben zu einer weiteren Klassifikation in Typ II a und Typ II b geführt. Der Typ II a (meist unter- bis normalgewichtige) ist charakterisiert durch Insulinbiosynthese bei verminderter Insulinsekretion. Weitaus häufiger ist der Typ II b (meist übergewichtige), bei dem es infolge zunächst erhöhter Insulinfreisetzung zu einer Insulinrezeptor-Downregulation und so zur Insulinresistenz kommt.

1.2. Therapeutika

Die Therapie der Typ I Diabetiker konzentriert sich aufgrund des absoluten Insulinmangels in erster Linie auf parenteral applizierte Insulin- sowie Insulinanalogazubereitungen. Bei den Typ II Diabetikern stehen neben Insulin zum einen peroral applizierte Biguanide und Thiazolidindione mit Wirkung auf den Glukose-Uptake in Fett- und Muskelzellen der Peripherie zur Verfügung. Als weitere Wirkstoffgruppe sind die ebenfalls peroral applizierten Sulfonylharnstoffe mit Wirkort an der Beta-Zelle zu nennen. Diese insulinfreisetzenden Substanzen werden auch noch heute - über 50 Jahre nach der Entdeckung ihrer blutzuckersenkenden Wirkung bei Typ II Diabetes mit Abstand am häufigsten verordnet. Ihre oft beobachtete starke Nebenwirkung, das Eintreten von Hypoglykämien, hat die Suche nach besseren, Glukose-abhängig wirkenden Therapeutika angetrieben.

wurde bisher eine Blockade ATP-abhängiger Kaliumkanäle der Plasmamembran (= K_{ATP} Blockade) angenommen. Infolge des verminderten Kaliumausstroms durch die K_{ATP} - Blockade kommt es zur Zelldepolarisation, Calciumionen strömen durch spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle in das Zytosol ein und erhöhen die Exozytose von Insulingranula (Trube et al., 1986; Cook et al., 1988). Ein entscheidender Nachteil der Sulphonylharnstoffe ist die o.g. unabhängig vom Plasmaglukosespiegel erfolgende Insulinfreisetzung. Dadurch kommt es bei den behandelten Patienten häufig zu bedrohlichen Hypoglykämien (Wolffenbüttel, 1999; Fuhendorff et al., 1998).

Imidazoline wie Phentolamin erhöhen ebenfalls die Insulinfreisetzung (Schulz und Hasselblatt, 1988). Ein wichtiger Unterschied zu den Sulphonylharnstoffen ist die Glukose-abhängige Insulinfreisetzung, wodurch das Risiko von Hypoglykämien deutlich verringert wird. Entgegen früherer Auffassung ist der insulinfreisetzende Effekt von Imidazolinen nicht auf alpha-2 blockierende Substanzen beschränkt (Schulz und Hasselblatt, 1989). Interessanterweise fand man für Phentolamin und andere insulinfreisetzende Imidazoline als Wirkmechanismus wie bei den Sulphonylharnstoffen eine K_{ATP} - Blockade (Abb.1-1) und nachfolgende Zelldepolarisation (Chan et al., 1991; Sheperd et al., 1996). Eine zentrale verbleibende Frage in diesem Zusammenhang ist der Grund für die Glukose-abhängige Wirkung der Imidazoline im Gegensatz zur Glukose-unabhängigen Wirkung der Sulphonylharnstoffe, obwohl mit dem K_{ATP} -Kanal für beide Substanzklassen das gleiche molekulare Target vorliegt.

Imidazoline sind in ihrer Wirkung an der Beta-Zelle nicht homogen (Rustenbeck et al., 1999). Zum einen unterscheiden sie sich in dem erreichbaren Maximaleffekt, zum anderen in der Wirkpotenz. Außerdem existieren neben insulinfreisetzenden Imidazolinen auch stark insulinsekretionshemmende Imidazoline (Renström et al., 1996; Hirose et al., 1997).

1.3.2. Insulin sezernierende Zelllinien INS 1 und MIN 6

Die Verfügbarkeit von primären Beta-Zellen für pharmakologische Untersuchungen ist durch die teure und aufwendige Tierhaltung sowie strenge Tierschutzgesetze

begrenzt. Deshalb wurden zahlreiche Versuche unternommen, um Zelllinien zu entwickeln, die eine normale Regulation der Insulinsekretion zeigen. Einige dieser Versuche sind erfolgreich verlaufen, mit dem Ergebnis von Zelllinien, die o.g. Anforderungen gerecht werden (Poitout et al., 1996). Bei der Entwicklung der Zelllinien wurden unterschiedliche Tiere und Verfahren verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden Imidazolinwirkungen in MIN 6 und INS 1 Zelllinien untersucht. Zunächst wurden RIN Zellen im Jahr 1973 von Chick und Mitarbeitern entwickelt (Chick et al., 1977). Dabei wurden Ratten mit Röntgenstrahlen behandelt und entwickelten daraufhin Pankreastumoren. Das Tumorgewebe wurde aus dem Pankreas herausgeschnitten und unter die Haut von 6 Wochen alten, gesunden Ratten verpflanzt. In diesen Ratten bildeten sich Sekundärtumore, die ebenfalls aus dem Gewebe herausgeschnitten und in Zellkulturbehältnisse überführt wurden, wo sie adhärent wuchsen und sich durch Zellteilung stetig vermehrten. 1992 haben Asfari und Mitarbeiter INS 1 Zellen von RIN Zellen weiterentwickelt (Asfari et al., 1992), indem sie Lymphozyten und RIN Zellen in Anwesenheit von 2-Mercaptoethanol kultivierten. Unter diesen Kulturbedingungen bildeten sich Zellaggregate, die sich morphologisch von RIN Zellen unterschieden. Sie wurden abgetrennt und weiterkultiviert, wobei 5-Mercaptoethanol für die Lebensfähigkeit der Zellen essentiell war. Diese Zellen wurden INS 1 Zellen genannt und haben gute Insulinfreisetzungseigenschaften, die primären Beta-Zellen ähnlich sind.

MIN 6 Zellen stammen ursprünglich von Mäusen ab. Um virale DNA in der Beta-Zelle zu exprimieren wurde durch Fusion des Humaninsulinpromotors mit der für das Antigen codierenden Region des Simian Virus 40 (= SV 40) rekombinante Onkogene hergestellt und in Mausembryos mikroinjiziert. Diese Embryos wurden in pseudoschwangere weibliche Mäuse implantiert und die Neugeborenen exprimierten spezifisch SV 40 in ihren Beta-Zellen. 10 bis 20 Wochen nach der Geburt entwickelten sich spontan Beta-Zelltumore, die daraufhin aus dem Pankreas herausgeschnitten, isoliert und anschließend in Kultur gebracht wurden (Miyazaki et al., 1990). MIN 6 Zellen haben sehr gute Insulinfreisetzungseigenschaften, die primären Beta-Zellen sehr ähnlich sind.

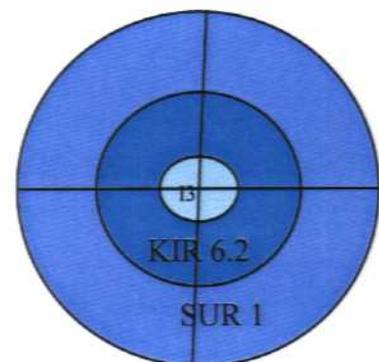
1.4. Der K_{ATP} -Kanal

1.4.1. Die molekulare Struktur des K_{ATP} -Kanals

Aufgrund der Bedeutung dieses Kationenkanals bezüglich der insulinfreisetzenden Wirkung von Sulfonylharnstoffen und Imidazolinen wird der molekulare Aufbau des Kanals näher erläutert. Der K_{ATP} -Kanal ist ein oktamerer Komplex und setzt sich zusammen aus 4 kanalporenformenden Untereinheiten Kir 6.2 sowie 4 regulatorischen Untereinheiten SUR 1 (Proks und Ashcroft, 1997; Clement et al., 1997; Inagaki et al., 1997). Die Untereinheit Kir 6.2 gehört zur Familie der voltage-independent inwardly rectifying K^+ channels. Das sind Gleichrichterkanäle, die nach innen mehr K^+ - Ionen passieren lassen als nach außen. Diese Kanäle mit einem Molekulargewicht von ~ 40 kDa werden physiologisch von cytosolischen Nucleotiden durch Bindung an Nucleotide Binding Domains (NBD) reguliert und verknüpfen den Zellmetabolismus mit elektrischer Aktivität und Kaliumströmen. SUR 1 steht für sulphonylurea receptor 1, der Rezeptor mit Affinität für Sulfonylharnstoffe. Er besteht aus 1581 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ~ 140 kDa. Die Untereinheit Kir 6.2 ist separat nicht funktionsfähig und benötigt eine räumlich enge Anbindung an SUR 1. K_{ATP} -Kanäle sind im Organismus weit verbreitet. Neben der pankreatischen Beta-Zelle findet man sie in Herz- und Skelettmuskel (mit SUR 2A) sowie in der glatten Muskulatur (mit SUR 2B).

Das Kanalporenprotein Kir 6.2 besitzt intrinsische ATP-Sensitivität, wohingegen der SUR 1 Rezeptor Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe, Kaliumkanalöffner und MgADP ist (Ashcroft, 2000).

Abb.1-2: Aufsicht auf die Kanalpore des K_{ATP} Kanals. Die postulierte Imidazolinbindungsstelle I_3 befindet sich innerhalb der kanalporenformenden K_{ATP} Kanal-Untereinheit Kir 6.2.



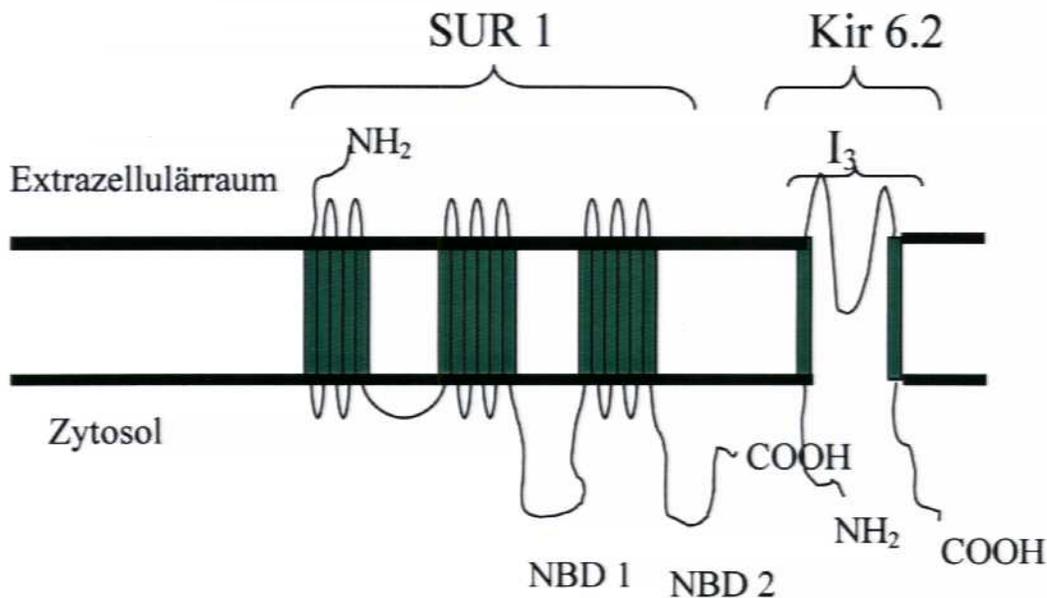


Abb.1-3: Die Kanalpore des K_{ATP} Kanals im Querschnitt innerhalb der Zellmembran. Die postulierte Imidazolinbindungsstelle I_3 befindet sich in der kanalporenbildenden K_{ATP} Kanaluntereinheit Kir 6.2.

1.4.2. Imidazoline und der K_{ATP} -Kanal

Wie bereits erwähnt, wandelte sich das Wissen über den Wirkmechanismus, der für die insulinfreisetzenden Effekte der Imidazoline verantwortlich ist. Viel beschrieben wurde zuletzt die Blockade des K_{ATP} -Kanals der Plasmamembran der pankreatischen Beta-Zelle. Phentolamin, eines der potentesten Imidazoline, blockierte intrazellulär appliziert in der Beta-Zelle K_{ATP} -Ströme mit einer EC_{50} von $0,7 \mu M$ (Proks und Ashcroft, 1997). Bei der Absicht Imidazoline weiterzuentwickeln und als Insulinsekretagoga einzusetzen muß die Verbreitung von K_{ATP} -Kanälen im gesamten Organismus berücksichtigt werden. Phentolamin hat auch unabhängig von der alpha-2 Rezeptorblockade verschiedene Wirkungen auf das kardiovaskuläre System. Beispielsweise verursacht Phentolamin eine Verlängerung des ventrikulären Aktionspotentials. Dieser Effekt beruht vermutlich auf der Blockade von K_{ATP} -Kanälen des Herzens (Lee et al., 1995). Der genaue Angriffsort der Imidazoline am K_{ATP} -Kanal ist noch nicht endgültig geklärt. Die bekannten Imidazolinrezeptorsubtypen I_1 und I_2 kommen Bindungsstudien zufolge nicht in Betracht, was zur Annahme eines neuen, anderen Imidazolinrezeptors I_3 geführt hat (Olmos et al., 1994). Molekularbiologisch manipulierte K_{ATP} -Kanäle mit fehlenden

SUR 1 Untereinheiten und isoliert verbleibenden Kir 6.2 Kanalproteinen zeigen keine Ionenströme mehr. Kir 6.2 Varianten mit am C-Terminus um 26 bzw. 36 Aminosäuren verkürzten Ketten (Kir6.2 Δ C26; Kir 6.2 Δ C36) lassen Ionenströme in Abwesenheit von SUR 1 dagegen zu. Diese Kir 6.2 Varianten wurden genutzt und haben in *Xenopus* Oozyten eine kanalblockierende Wirkung von ATP und Phentolamin gezeigt. Der Vergleich zwischen Kir 6.2 + SUR 1 zu Kir6.2 Δ C26 ohne SUR 1 ergab für Phentolamin eine annähernd gleiche EC_{50} von $\sim 1 \mu M$. Diese Untersuchungen haben somit gezeigt, daß die postulierte I_3 -Bindungsstelle vermutlich Teil der kanalporenformenden K_{ATP} -Untereinheit Kir 6.2 ist (Proks und Ascroft, 1997).

Man vermutet, daß vier Kir 6.2 Untereinheiten zusammen die funktionierende Kanalpore formen (Clement et al., 1997; Inagaki et al., 1997). Es ist aber nicht bekannt, ob jede Kir 6.2 -Untereinheit eine Imidazolinbindungsstelle I_3 besitzt, oder 4 Kir 6.2 -Untereinheiten eine I_3 -Bindungsstelle teilen. Ein weiterer Hinweis auf eine vom SUR 1 unterschiedliche Imidazolinbindungsstelle ist der Befund, daß $^3[H]$ Glibenclamid nicht durch Imidazoline von der Plasmamembran von Beta-Zellen verdrängt wird (Brown et al., 1993).

Das Protein Kir 6.2 wird in Beta-Zellen, Herz, Gehirn und Skelettmuskel exprimiert, und dient vermutlich in allen genannten Geweben als porenformende Untereinheit des K_{ATP} -Kanals. Der SUR Rezeptor wird in den Geweben dagegen in unterschiedlicher Form exprimiert. In Beta- Zellen findet man SUR 1 im Gegensatz zu SUR 2A im Herzen. Die Wirkung von Phentolamin sowohl in Beta-Zellen als auch in Herzzellen spricht deshalb ebenfalls für die Kanalpore Kir 6.2 als Ort einer Imidazolin I_3 -Bindungsstelle (Proks und Ashcroft, 1997).

1.4.3. Imidazoline und K_{ATP} -Kanal unabhängige Wege der Insulinfreisetzung

Neben dem K_{ATP} -Kanal als molekularem Angriffsort von Imidazolinen in der Beta-Zelle wurden noch andere, von diesem Ionenkanal unabhängige mögliche Wirkmechanismen diskutiert (Zaitsev et al., 1996; Zaitsev et al., 1999). Die Imidazolinverbindung RX 871024 blockierte K_{ATP} -Ströme in pankreatischen Beta-

Zellen von Ratten sowie in HIT T15 Beta-Zellen. Zusätzlich konnte mittels Fura-2 Analytik ein Anstieg der intrazellulären $[Ca^{2+}]$ Konzentration gezeigt werden. Diese Ergebnisse bestätigten zunächst die typische zuvor beschriebene Imidazolinwirkung der K_{ATP} -Kanalblockade in Beta-Zellen. Darüberhinaus wurde RX 871024 in elektropermeabilisierten Ratteninseln in einer stimulierenden Konzentration von 20 μM appliziert. Durch die Zellmembranpermeabilisierung und den Wegfall der natürlichen Ionenbarriere konnte die Ca^{2+} Konzentration auch in dem zytosolischen Bereichen beliebig eingestellt werden. RX 871024 setzte sowohl bei einer Ca^{2+} Konzentration von 1 μM als auch 100 μM im Vergleich zur Kontrolle zusätzlich signifikant Insulin frei. Diese von der Ca^{2+} Konzentration unabhängige Insulinfreisetzung indizierte auch eine K_{ATP} -unabhängige Wirkung, da sich in intakten Zellen der Blockade des K_{ATP} -Kanals und nachfolgender Zelldepolarisation ein Ca^{2+} Einstrom anschließt und letztlich eine Erhöhung der intrazellulären $[Ca^{2+}]$ Konzentration die Insulinexozytose bewirkt. Die Frage nach den vom K_{ATP} -Kanal unterschiedlichen molekularen Angriffsorten der Imidazoline blieb trotz o.g. Befunde weiterhin offen. Die entscheidende neue Information war die Erkenntnis von mindestens einem zusätzlichen für die Insulinfreisetzung verantwortlichen Wirkmechanismus einer Imidazolinbindung innerhalb der Beta-Zelle.

1.4.4. Imidazoline mit insulinsekretionshemmender Wirkung

Neben Imidazolinen mit insulinfreisetzender Wirkung gibt es interessanterweise auch Imidazolinderivate mit insulinsekretionshemmender Wirkung. Über Clonidin gibt es beispielsweise zahlreiche Veröffentlichungen, die einen hemmenden Effekt hinsichtlich der Insulinfreisetzung beschreiben (Renström et al., 1996; Abel et al., 1996; Kampermann et al., 2000). Analog zu Adrenalin, einem Ethanolaminderivat, kommt es bei Clonidin durch alpha-2 Rezeptoragonismus zur Sekretionshemmung. Das genaue Wirkprofil dieser Imidazoline ist jedoch sehr komplex, da sie mehrere molekulare Angriffspunkte in der Beta-Zelle haben. So wurden für Clonidin einerseits hyperpolarisierende Effekte beschrieben, die auch Glukose-induzierte Zelldepolarisationen aufheben konnten. Die Hyperpolarisation wurde durch Öffnung

von K^+ Kanälen vermittelt, die sich vom K_{ATP} -Kanal unterscheiden (Abel et al., 1996). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise auf eine Blockade von K_{ATP} -Kanälen in pankreatischen Beta- Zellen durch Clonidin, wobei die betreffenden Ergebnisse auf der Patch-Clamp Methode beruhen und die Effekte nicht in intakten Beta-Zellen gezeigt wurden. Am K_{ATP} -Kanal konnte [3H] Clonidin durch Phentolamin, nicht aber durch Tolbutamid verdrängt werden (Rustenbeck et al., 1997). Diese Verdrängungsexperimente mit Imidazolinen und einem Sulphonylharnstoff deuten auf einen Angriff von Clonidin am postulierten I_3 Rezeptor der K_{ATP} - Kanalporenuntereinheit Kir 6.2 hin.

1.4.5. Der K_{ATP} -Kanal als zentraler, gemeinsamer Angriffsort von Imidazolinen

Den bisher beschriebenen Imidazolinen liegen jeweils mehrere, verschiedene molekulare Angriffspunkte sowie unterschiedliche pharmakologische Wirkungen zugrunde. Mit dem K_{ATP} -Kanal haben die meisten bisher auf Insulinsekretion und K_{ATP} -Kanalblockade untersuchten Imidazoline einen gemeinsamen molekularen Angriffsort. Sowohl für die sekretionssteigernden als auch für die sekretionshemmenden Imidazoline liegen dementsprechende Daten vor, wobei die K_{ATP} -Kanalblockade bei den sekretionshemmenden Substanzen durch zusätzlichen alpha-2 Agonismus überkompensiert wird (Rustenbeck et al., 1997). Nur eine insulinfreisetzende Imidazolinverbindung ohne Einfluß auf den K_{ATP} -Kanal wurde bislang beschrieben (Efanov, Zaitsev, Mest et al., 2001).

1.5. Neue Imidazoline

Die bisher durchgeführten Experimente mit den oben abgebildeten Imidazolinen zeigten eine Glukose-abhängige Insulinfreisetzung in vivo und in vitro. BL 11778 beispielsweise führte in Zucker diabetic fatty (=ZDF) rats zu einer Reduktion der Blutglukosekonzentration sowie zu einer Verzögerung des natürlichen Abfalls der Plasmainsulinkonzentration (Mest et al., 2001). Mit BL 11282 wurden elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt, die eine fehlende K_{ATP} -

kanalblockierende Wirkung der Substanz in Beta-Zellen zeigte (Efanov, Zaitsev, Mest et al., 2001). Für die anderen Substanzen liegen bislang keine publizierten Daten über Insulinfreisetzung oder eine K_{ATP} -kanalblockierende Wirkung in Beta-Zellen vor.

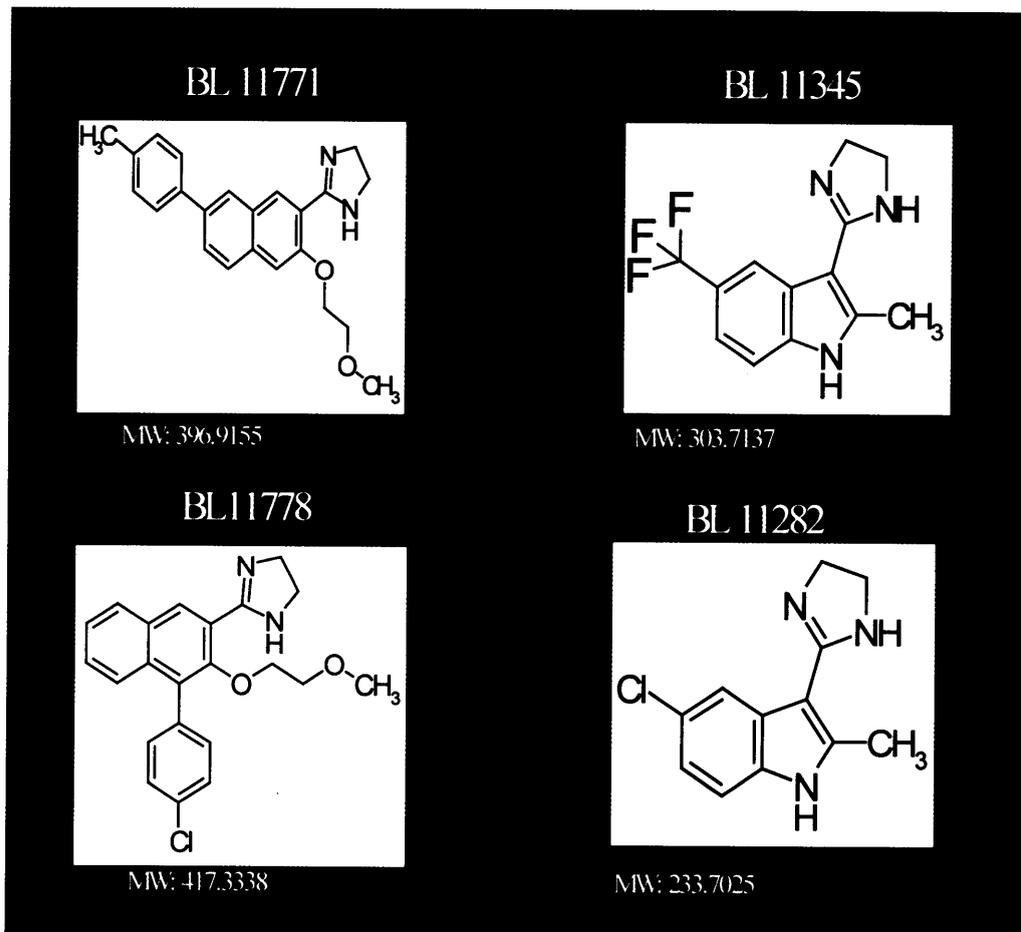


Abb.1-4: Strukturformeln neuer Imidazoline.

1.6. Die Imidazolinbindungsstellen (=Imidazoline Binding Sites, IBS)

Der Begriff von Imidazolinbindungsstellen entwickelte sich durch verschiedene Bindungsstudien mit dem alpha-2 Agonisten Clonidin. Basierend auf den unterschiedlichen festgestellten Wirkungen von im Gehirnstamm injizierten Imidazolinen und Katecholaminen haben Bousquet und Mitarbeiter die Existenz von bislang unbekanntem Rezeptoren postuliert, die Imidazoline und Guanidine spezifisch binden (Bousquet et al., 1984; Bousquet 1995). Diese Vermutung wurde später durch

Untersuchungen bestätigt, die nur eine ~70% ige Bindung des Clonidinderivates [³H] Para-Aminoclonidin an alpha-2 Rezeptoren zeigten. Die verbliebene Restbindung kam durch nichtadrenerge Bindungsstellen zustande, die eine hohe Affinität für Imidazoline und Imidazole hatte (Ernsberger et al., 1987). Um sie von alpha-2 Rezeptoren zu unterscheiden, wurden sie als Imidazolinbindungsstellen bzw. Imidazoline Binding Sites (=IBS) bezeichnet. Da die verschiedenen IBS sich in ihren Bindungsspezifitäten, Gewebeverteilungen, subzellulären Lokalisationen sowie ihren eigenen strukturellen Eigenschaften unterscheiden, stellen sie eine heterogene Bindungsstellenfamilie dar (French 1995; Parini et al., 1996; Regunathan und Reis, 1996). Um bei einer Bindungsstelle auch von einem Rezeptor sprechen zu können, ist die nachweisliche Existenz eines endogenen Liganden mit intrinsischer Aktivität an dem potenziellen Rezeptor erforderlich. 1984 hatten Atlas und Burstein erstmals ein physiologisches Substanzgemisch in Ratten- und Rinderhirn gefunden und beschrieben, das [³H] Clonidin mit hoher Affinität von seiner Bindungsstelle verdrängte. Bis heute konnte die genaue Identität dieser Clonidin verdrängenden Substanz (=Clonidine Displacing Substance, CDS) nicht geklärt werden. Sie hat ein Molekulargewicht von ~588 Da und ist weder ein Katecholamin noch ein Peptid. CDS wurde mittlerweile in menschlichem Serum, in Zerebrospinalflüssigkeit und mit der höchsten Konzentration in adrenergen Drüsen gefunden. Interessanterweise führte die Entfernung der adrenergen Drüsen zu deutlich erniedrigten CDS Serumspiegeln. Dies war ein Hinweis auf diese Drüsen als Quelle der zirkulierenden CDS (Meeley et al., 1992). Agmatin, die decarboxylierte Form von physiologischem L-Arginin kann auch [³H] Para-Aminoclonidin von seinen Bindungsstellen verdrängen und wurde zunächst als Kandidat für die CDS angesehen. Das Agmatinmolekulargewicht von 130 Da sowie die IBS-Affinität entsprechen jedoch nicht denen der CDS. CDS und Agmatin zeigten beide biologische Aktivität in verschiedenen Gewebearten. Trotz der bis heute nicht geklärten molekularen Identität der CDS besteht durch ihre biologische Aktivität und IBS-Affinität eine Möglichkeit für die Aufklärung der Proteinstrukturen der Imidazolinbindungsstellen. Mit geeigneten Ligandbindungsstudien könnte dann eine `echte` neue Rezeptorfamilie konkret beschrieben und weiter klassifiziert werden (Molderings et al., 2000; Musgrave und Hughes, 1999; Brasili, 2000). Durch Verwendung verschiedener radioaktiv markierter Imidazolinverbindungen konnten die IBS genauer definiert werden. Demnach

existieren mindestens die zwei Bindungsstellen I_1 und I_2 wobei I_1 eine hohe Affinität für $[^3\text{H}]$ Moxonidin $> [^3\text{H}]$ Phentolamin $> [^3\text{H}]$ Clonidin und eine sehr niedrige Affinität für $[^3\text{H}]$ Idazoxan besitzt. Die Bindungsstelle I_2 hat eine hohe Affinität für $[^3\text{H}]$ Idazoxan, jedoch eine niedrige Affinität für $[^3\text{H}]$ Phentolamin und $[^3\text{H}]$ Clonidin. Die Bindungsstellen I_1 sind in den Zellmembranen von Hirn-, Nieren-, Prostata- und anderen Gewebearten zu finden. Die Bindungsstellen I_2 sind sowohl in den Zellmembranen als auch in den äußeren mitochondrialen Membranen in Hirn-, Herz-, Leber-, Pankreas- und anderen Geweben zu finden (Molderings, 1997). In bezug auf die insulinfreisetzende Wirkung von Imidazolinen in Beta-Zellen konnten weitere Untersuchungen bislang den entscheidenden Wirkort nicht aufklären. Durch mehrere Experimente konnte jedoch mittlerweile gezeigt werden, daß die insulinfreisetzende Wirkung von Imidazolinen nicht über die zwei Bindungsstellen I_1 und I_2 vermittelt wird (Olmos et al., 1994). In diesem Zusammenhang stand auch das Postulat der Existenz einer I_3 Imidazolinbindungsstelle in Beta-Zellen, über die Insulinfreisetzungseffekte vermittelt werden. Da als entscheidender Wirkmechanismus der durch Imidazoline induzierten Insulinfreisetzung in Beta-Zellen lange Zeit eine Blockade der K_{ATP} -Kanäle der Plasmamembran angenommen wurde, schien eine Lokalisation der postulierten I_3 Imidazolinbindungsstelle an bzw. in diesem Ionenkanal logisch. Untersuchungen von Proks und Ashcroft zeigten 1997, daß nach Expression einer modifizierten kanalporenformenden Untereinheit Kir6.2 des K_{ATP} -Kanals in *Xenopus* Oozyten das Imidazolin Phentolamin eine Blockade dieser Kanalpore verursachte. Dies wurde zunächst als Bestätigung der Annahme einer Lokalisation der postulierten I_3 Imidazolinbindungsstelle an bzw. in dem K_{ATP} -Kanal gesehen. Weitere Publikationen haben allerdings mittlerweile gezeigt, daß stark insulinfreisetzende Imidazoline ohne depolarisierende Eigenschaften existieren (Efanov, Zaitsev, Mest et al., 2001). Efanov, Hoy et al. zeigten in einer weiteren Publikation 2001, daß Imidazoline in Beta-Zellen von SUR 1 Knockout-Mäusen, bei denen K_{ATP} -Kanäle in der Plasmamembran fehlten, eine unveränderte Steigerung der Insulinfreisetzung vermittelten. Diese Ergebnisse deuten auf einen intrazellulären Wirkort der Imidazoline hin, fernab der K_{ATP} -Kanäle der Plasmamembran. Die Frage, inwiefern die Imidazoline über einen Rezeptor, ein Enzym, einen Ionenkanal oder andere Wirkorte die Insulinfreisetzung vermitteln blieb offen und war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.7. Alpha –Rezeptoren der Beta-Zelle

Die bislang in die Therapie eingeführten Imidazolinverbindungen vermitteln alle vorwiegend über alpha Rezeptoren an verschiedenen Endorganen ihre Wirkungen. Alpha Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Infolge der Bindung eines Agonisten an den Rezeptor ändert sich die Konformation des Rezeptorproteins. Diese Änderung pflanzt sich auf das G-Protein fort: die G-Protein alpha-Untereinheit gibt GDP ab und bindet GTP, löst sich von den beiden anderen Untereinheiten, tritt in Kontakt mit einem Effektorprotein und verändert dessen Funktionszustand. Man unterscheidet alpha Rezeptoren in die Subtypen alpha-1 und alpha-2, die wiederum in weitere Subtypen aufgegliedert werden, auf die hier nicht weiter eingegangen wird. Klassische Effektorproteine bei alpha-1 Rezeptoren sind die Phospholipase C (=PLC) mit nachfolgender Erhöhung der Inositoltriphosphat- (=IP3) Konzentration und bei alpha-2 Rezeptoren die Adenylatzyklase, deren Hemmung nachfolgend zur Reduktion der cAMP Konzentration führt. Alpha-1 Rezeptoren finden sich hauptsächlich postsynaptisch an den vom Sympathicus innervierten Endorganen. Alpha-2 Rezeptoren finden sich sowohl postsynaptisch am innervierten Endorgan als auch präsynaptisch vor den vom Sympathicus innervierten Endorganen. Präsynaptischer alpha-2 Agonismus führt zu einer negativen Rückkopplung mit darauffolgender Reduktion der Noradrenalinausschüttung in den synaptischen Spalt. In den Beta-Zellen des Pankreas sind vor allem die Funktionen der alpha-2 Rezeptoren von Bedeutung. Agonismus an diesen alpha-2 Rezeptoren führt nach derzeitigen Erkenntnissen jedoch nicht wie sonst bei diesem Rezeptor üblich zu einer Veränderung der cAMP Konzentration (Ullrich und Wollheim, 1984). Es findet vielmehr eine Sekretionshemmung ohne im Zytosol diffundierende second messenger, sondern durch eine über inhibitorische G-Proteine gekoppelte Aktivierung von Inhibitionsproteinen statt, wobei das für die Wirkung letztlich verantwortliche Inhibitionsprotein noch nicht bekannt ist (Lang et al., 1995). Ein zusätzlicher Effekt ist eine Hyperpolarisation der Beta-Zellen, die allerdings nicht hauptverantwortlich für die Sekretionshemmung ist (Kampermann et al., 2000).

1.8. Calcium und Insulinfreisetzung

Calciumionen spielen eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Exozytose von Insulingranula. Der Konzentrationsunterschied zwischen Extrazellulärraum und Zytosol ist mit einem Faktor von ca. 10000 bei Ca^{2+} Ionen von allen Kationen am größten. Die Ca^{2+} Konzentration beträgt im Interstitium ca. 2,5 mM und ca. 180 nM in der Zelle. Die freie Ca^{2+} Konzentration im Zytosol ist variabel und kann über Ca^{2+} Ströme durch verschiedene Ca^{2+} und Kationenkanäle, die unterschiedliche Spezifität und Funktionsweise haben erhöht werden. Daneben gibt es energieabhängige Ca^{2+} Symport- und Antiportsysteme, die ebenfalls die Ionenkonzentrationen verändern können. In der Beta-Zelle spielen für die Insulinfreisetzung in erster Linie spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} Kanäle eine wichtige Rolle. Durch einen Anstieg des Membranpotentials von ca. -80 mV auf ca. -40 mV, der beispielsweise über eine K_{ATP} -Kanalblockade vermittelt wird, erhöht sich die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser L-Typ Ca^{2+} Kanäle. Ca^{2+} kann somit vermehrt in die Beta-Zelle einströmen, und die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration steigt von ca. 180 nM auf ca. 800 nM an (Quesada et al., 1999), wobei die gemessenen und in der Literatur beschriebenen Konzentrationen stark vom Typ der Beta-Zellen sowie den Zellkulturbedingungen abhängen. Eine Erhöhung der intrazellulären freien Ca^{2+} Konzentration kann außerdem durch Freisetzung von Ca^{2+} aus zytosolischen Ca^{2+} Speichern wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum oder Insulingranula erfolgen (Gilon et al., 1999; Mears et al., 1999; Iino et al., 2000). Durch Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Zytosol in solche Speicher kann umgekehrt die Ca^{2+} Konzentration intrazellulär auch abnehmen (Efanova et al., 1998; Scheenen et al., 1998). Die Wirkungen des intrazellulären Calciums bezüglich der Insulinexozytose sind noch nicht genau bekannt, wobei eine bedeutende Kopplung des zytosolischen Ca^{2+} Konzentrationsanstiegs die Aktivierung der Calcium Calmodulin abhängigen Kinase II (= CaM Kinase II) ist (Easom, 1999; Krueger et al., 1999). Weitere Proteine wie Synaptotagmine wurden in den Zusammenhang mit Ca^{2+} und Insulinfreisetzung gebracht (Gao et al., 2000; Brown et al., 2000; Lang et al., 1997).

1.9. Glukose und Insulinfreisetzung

Glukose ist der wichtigste Energielieferant der Zelle. Bei der Glukoseverstoffwechslung wird letztlich der zytosolische AdenosinTriphosphat-Spiegel erhöht und das Verhältnis ATP/ADP zugunsten von ATP verschoben. Neben der Funktion als Energieträger kommt ATP in der Beta-Zelle eine elektrophysiologische Bedeutung zu. Durch Bindung an die zytosolische Seite von K_{ATP} Kanäle werden deren Kanalporen blockiert und die Kaliumströme aus der Zelle heraus vermindert (Dorschner et al., 1999, Gribble et al., 1998). Als Folge davon depolarisiert die Beta-Zelle, Ca^{2+} strömt in die Zelle ein und führt zur Insulinexozytose. Dieser Effekt wird auch als K_{ATP} Kanal-abhängige Glukosewirkung bezeichnet (Hohmeier et al., 2000). Daneben wird ein Teil der durch Glukoseverstoffwechslung gewonnenen Energie für die Insulingranulawanderung und anschließende Exozytose verbraucht (Yajima et al., 1999). Andere Untersuchungen haben außerdem gezeigt, daß Glukose auch depolarisationsunabhängig Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freisetzen kann (Jijakli und Malaisse, 1998). Daher spricht man in diesen Fällen auch von einer K_{ATP} Kanal-unabhängigen Glukosewirkung (Aizawa et al., 1998; Straub et al. 1998).

1.10. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten sowohl alte, aus der Literatur bekannte als auch neu synthetisierte, bislang unbekannte Imidazolinverbindungen untersucht werden. Dabei stand die weitere Aufklärung der Wirkmechanismen dieser Substanzen hinsichtlich ihrer insulinfreisetzenden Wirkungen in Beta-Zellen im Mittelpunkt. Bei den neuen, unbekanntenen Imidazolinen galt es deshalb zunächst zu klären, ob wie bei allen bislang auf Insulinfreisetzung untersuchten Imidazolinen eine K_{ATP} –Kanalblockade stattfindet und inwieweit die Substanzen weitere, davon unabhängige Wirkungen haben. Die Beeinflussung des Membranpotentials durch Imidazoline sollte mit der Bisoxonol-Methode untersucht werden, um Rückschlüsse auf eine K_{ATP} –kanalblockierende Wirkung ziehen zu können. Um die Frage eines vom K_{ATP} -Kanal

unterschiedlichen Wirkortes zu klären, sollte deshalb insbesondere das Zytosol und die Zellorganellen, fernab des K_{ATP} -Kanals der Plasmamembran untersucht werden. Mögliche intrazelluläre Bindungs- und Wirkorte der Imidazoline sollten durch Anwendung geeigneter Analysenmethoden identifiziert werden. Eine weitere Aufgabe war es, bei insulinsekretionshemmenden Imidazolininen den bislang nur durch Patch-Clamp Experimente belegten K_{ATP} -Effekt in intakten Beta-Zellen durch Demaskierung mit entsprechender pharmakologischer Wirkung zu zeigen. Ein wichtiger Bestandteil der Arbeit war die Bestimmung der Insulinkonzentration im extrazellulären Bereich nach Inkubation von Beta-Zellen mit unterschiedlichen Substanzen. Die Wirkstoffe sollten durch Erstellen von Konzentrations-Wirkungskurven und daraus ableitbaren pharmakologischen Kenngrößen charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang standen auch Kombinationen der Imidazoline mit anderen Wirkstoffen, um Fragen nach additiven Effekten, agonistischen/ antagonistischen Wirkungen und anderen Einflüssen auf die Konzentrations-Wirkungskurven der jeweiligen Imidazoline zu klären. Die Insulinfreisetzungsversuche sollten außerdem bei verschiedenen Versuchsmodifikationen, wie z.B. Änderung der Zusammensetzung des Zellinkubationsmediums, Änderung der Inkubationsdauer oder unterschiedliche Vorbehandlungen der Zellen durchgeführt werden, um weitere Rückschlüsse auf Imidazolinwirkmechanismen ziehen zu können. Durch Untersuchungen zu cAMP-Konzentrationsänderungen nach Imidazolininkubation wurde dieser second messenger, der bei der physiologischen Insulinsekretion bekanntlich eine große Rolle spielt miteinbezogen.

2. Material und Methoden

2.1. Zelllinien

2.1.1. MIN 6 Zelllinie

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, leiten sich MIN 6 Zellen von pankreatischen Maus-Beta-Zellen ab, die im Vergleich zu den Primärzellen eine sehr ähnliche Zellphysiologie und Glukose-abhängige Insulinfreisetzung haben. MIN 6 Zellen wurden in den Passagen 26-52 als adhärenente Zellen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, wobei 'Passagieren' das Ablösen und erneute Umverteilen von Zellen in neue Zellkulturflaschen bedeutet. Die Verwendbarkeit der Zellen bezüglich ihrer Passagezahl wurde durch Erstellen von Glukose-Response Kurven festgestellt. Hierbei wurde die Insulinfreisetzung in Abhängigkeit der Glukosekonzentration untersucht. MIN 6 Zellen wurden in einer Zellzahl zwischen 2,5 und 8 Mio. in 162 cm² Costar-Flaschen (Corning-Costar Inc., Acton, MA 01720, USA) ausgesät und mit 25 mM Glukose haltigem Dubecco's Modified Eagle Medium =DMEM kultiviert, wobei 500 ml des DMEM-Mediums mit 50 ml Fötalem Kälberserum (=FCS), 5 ml Penicillin 10000 I.U./Streptomycin 10000 µg pro ml 1:1 (=PenStrep) sowie 500µl 50 mM Mercaptoethanol ergänzt wurden. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Die Zellen wurden im subkonfluenten bis konfluenten Zustand mit calcium- und magnesiumfreiem Phosphate Buffer Saline (=PBS) 1x gewaschen, mit 6 ml PBS/Trypsin-EDTA 1:1 drei Minuten bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert und danach mit 24 ml DMEM ergänzt um die Trypsinierung zu stoppen. Danach folgte eine 4 minütige Zentrifugation bei 1000g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgesogen, das Zellpellet durch Klopfen gegen das Probenröhrchen mechanisch zerteilt und mit 10 ml DMEM durch Auf- und Abpipettieren in engen 5 ml Pipetten resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend zwischen ein Deckglas und Neubauer-Zählkammer pipettiert, und durch Auszählen der Quadrate und Multiplikationsfaktor 10000 die Zellkonzentration in Zellzahl/ml Suspension ermittelt. Für die Zellkultur bzw. Insulinsekretionsversuche wurde die Zellsuspension

dann in der gewünschten Menge ausgesät und mit Kultur-DMEM auf das nötige Nährvolumen ergänzt.

2.1.2. INS 1 Zelllinie

INS 1 Zellen leiten sich ursprünglich (siehe Einleitung) von primären pankreatischen Ratten-Beta-Zellen ab, die wie MIN 6 Zellen im Vergleich zu den Primärzellen eine ähnliche Zellphysiologie und Glukose-abhängige Insulinausschüttung zeigen. INS 1 Zellen wurden in den Passagen 30-75 als adhärenente Zellen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Verwendbarkeit der Zellen bezüglich ihrer Passagezahl wurde durch Erstellen von Glukose-Response Kurven festgestellt. Hierbei wurde die Insulinfreisetzung in Abhängigkeit der Glukosekonzentration untersucht. INS 1 Zellen wurden in einer Zellzahl zwischen 3 und 8 Millionen in 162 cm² Costar-Flaschen (Corning-Costar Inc., Acton, MA 01720, USA) ausgesät und mit 25 mM Glukose RPMI 1640 Medium kultiviert. Für die Zellkultur wurden 465 ml des RPMI 1640 Mediums mit 25 ml Fötalem Kälberserum (=FCS), 5 ml Penicillin 10000 I.U./Streptomycin 10000 µg pro ml 1:1 (=PenStrep), 500µl 50 mM Mercaptoethanol, 5 ml 1M Hepes, 5 ml 200mM L-Glutamin sowie 500 µl 1M Natriumpyruvat ergänzt. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Die Zellen wurden im subkonfluenten bis konfluenten Zustand mit calcium- und magnesiumfreiem Phosphate Buffer Saline (=PBS) 1x gewaschen, mit 6 ml PBS/Trypsin-EDTA 8:1 eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 20 ml DMEM ergänzt um die Trypsinierung zu stoppen. Danach folgte eine 4 minütige Zentrifugation bei 1000g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgesogen, das Zellpellet durch Klopfen gegen das Probenröhrchen mechanisch zerteilt und mit 10 ml RPMI 1640 durch Auf- und Abpipettieren in engen 5 ml Pipetten resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend zwischen ein Deckglas und Neubauer-Zählkammer pipettiert, und durch Auszählen der Quadrate und Multiplikationsfaktor 10000 die Zellkonzentration in Zellzahl/ml Suspension ermittelt. Für die Zellkultur bzw. Insulinsekretionsversuche wurde die Zellsuspension dann in der gewünschten Menge ausgesät und mit Kultur-RPMI 1640 auf das nötige Nährvolumen ergänzt.

2.1.3. HEK 293 Zelllinie

Diese Zelllinie leitet sich von menschlichen Nierenzellen ab. Die Zellen haften nach Zellkultur bei 37° C nach einigen Tagen wieder an. Die 162 cm² Flaschen (Costar, USA) wurden mit Poly D-Lysin beschichtet. Als Wachstumsmedium wurde phenolrotfreies DMEM/F-12 mit zusätzlich Natriumbicarbonat 2,2 g/l, Ethanolamin-HCl 4,877 mg/l, Tobramycinsulfat 50 mg/l sowie 5% FCS verwendet. Beim Splitten der Zellen nach jeweils 2 Tagen Wachstum wurde das Medium abgesogen und die Zellen 1x mit 15 ml EBSS ohne BSA gespült. Anschließend wurde 1-2 Minuten mit 0,25% Trypsin, 1 mM EDTA, Ca²⁺ / Mg²⁺ freiem Puffer behandelt. Die Trypsinierung wurde mit 20 ml Medium gestoppt, die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und 9 Minuten bei 200g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesogen und das Pellet in 12 ml DMEM resuspendiert. Die hier verwendeten HEK 293 Zellen wurden mit dem cAMP-abhängigen Promotor und dem Luciferase-Gen transfiziert. Dieser Promotor erhöht die Luciferase-Expression, und seine Aktivität ist durch cAMP induzierbar. Das ubiquitäre cAMP-Response-Element-Binding (=CREB) Protein tritt durch Erhöhung der cAMP Konzentration, beispielsweise nach Aktivierung der Adenylatzyklase, in Wechselwirkung mit dem o.g. Promotor mit dessen nachfolgender Aktivierung. Das bedeutet, daß bei hohen cAMP Konzentrationen viel Luciferase gebildet wird.

2.2. Insulinfreisetzungsversuche mit statischer Inkubation

Um die insulinfreisetzenden Einflüsse verschiedener Substanzen zu testen, wurden die Zellen folgendermaßen präpariert:

Am 1.Tag wurden 30000 MIN 6 bzw. 10000 INS 1 Zellen in dem jeweiligen 25 mM Glukose-Medium mit einem Volumen von 200 µl in jedes Loch einer 96-Lochplatte pipettiert. Danach wuchsen die Zellen 3 weitere Tage lang (bis zum 4.Tag) in diesem Medium bei 37° C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Am Versuchstag (4.Tag) wurde das Medium verworfen und die adhärent gewachsenen Zellen 3 mal mit jeweils 200 µl

37° C warmem Earle's Balanced Buffer Saline 0,1 % BSA (=EBSS) gewaschen. Unmittelbar danach wurden die Zellen mit 200µl des jeweiligen 0 mM Glukose-Mediums 1 Stunde bei 37° C und 5 % CO₂ im Brutschrank gehungert. Anschließend daran wurden die Substanzverdünnungen (s.u.) mit 200 µl 25 mM Glukose-EBSS auf die 96-Lochplatte pipettiert und eine weitere Stunde bei 37° C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am Ende dieser Stimulationszeit wurden die Zellplatten auf 96-Loch Filterplatten des gleichen Formats umpipettiert und filtriert. Das Filtrat wurde 1:51 mit EBSS verdünnt und die Insulinkonzentration mit einer Radio Immuno Assay (=RIA) Methode (s.u.) bestimmt. Pertussis Toxin (=PTX) wurde vor dem ersten o.g. Waschschrift für 6-18 Stunden (100-200 ng/ml) mit den Zellen präinkubiert. PTX reagiert mit G_i Proteinen von alpha-2 Rezeptoren und führt durch ADP-Ribosylierung zur Inaktivierung dieser Rezeptoren. Nach der Präinkubation erfolgte die o.g. Methode.

2.3. Radio Immuno Assay (=RIA)

Für die Bestimmung der Insulinkonzentration wurde eine modifizierte RIA Methode genutzt. Grundlage war der Ratteninsulin RIA-Test von Linco (Linco Research INC., St.Charles, MO, USA) mit 100% Kreuzreaktivität für Mausinsulin. Die o.g. Filtrate mit 1:51 EBSS-Verdünnung wurden bei -20° C gelagert und für die RIA-Bestimmung bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach erfolgte das Pipettieren von jeweils 50 µl Probe in Polyethylenphthalat 96 Well-Mikrotiterplatten (Wallac, Turku, Finnland). Die Proben wurden weiter ergänzt mit 50 µl Test-Puffer (0,05 M Phosphatsalzlösung pH 7,4 sowie 0,025 M EDTA, 0,1% NaN₃ und 1% insulinfreies, RIA-taugliches Rinderserumalbumin (=BSA), 50µl [¹²⁵I] markierter Insulintracelerlösung, und 50 µl einer Ratteninsulinantikörperlösung (aus dem Meerschweinchen). Parallel wurden Ratteninsulinstandards mit den gleichen Reagenzien pipettiert um eine Eichkurve zu erhalten. Um die normalerweise bei RIA-Methoden typische Abtrennung des Antigen-Antikörperkomplexes von ungebundenem Antigen zu umgehen, wurden zu dem 200 µl Gemisch Protein A

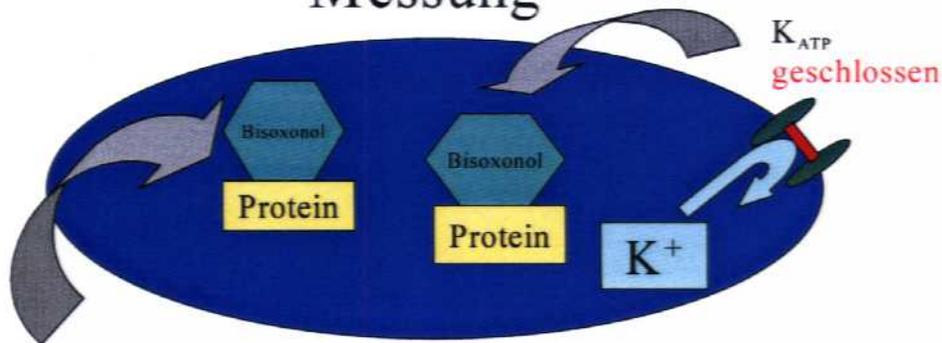
beschichtete und Antikörperbindende Scintillation Proximity Assay (=SPA) Kügelchen (Amersham International, Buckinghamshire, UK) hinzugefügt. Die Mikrotiterplatten mit dieser Gesamtmischung wurden dann abgedeckt und 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten in einen Liquid Scintillation + Luminescence Counter (Wallac, Turku, Finnland) zum Auszählen gestellt. Die Detektion erfolgte folgendermaßen: das [¹²⁵I] markierte Insulin konkurriert kompetitiv mit unmarkiertem Insulin um die Bindungsstellen an Insulinantikörpern, die wiederum an den SPA-Kügelchen haften. Der radioaktiv markierte Ligand erzeugt durch Wechselwirkung mit der Fluomikrosphäre der Protein A Schicht Lichtquanten. Dementsprechend ist die Anzahl an gemessenen Impulsen im Photomultiplier bei Anwesenheit von viel aus Beta-Zellen freigesetztem Insulin gering. Mit der Eichkurve konnten die Meßwerte entsprechend umgerechnet werden. Ein geringes Lichtsignal bedeutet eine große Insulinfreisetzung im jeweiligen Versuch.

2.4. Bisoxonol-Membranpotenzialsmessung

Die Bisoxonol-Membranpotenzialsmessung wurde durchgeführt wie früher (Lang et al., 1998) beschrieben mit folgenden geringfügigen Veränderungen:

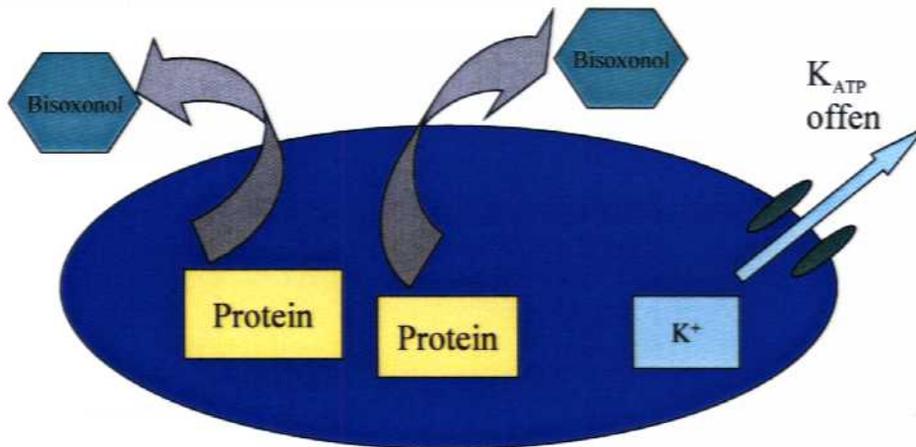
MIN 6 Zellen und INS 1 Zellen wurden kultiviert und trypsinisiert wie unter `MIN 6 Zelllinie` und `INS 1 Zelllinie` dargestellt. Bei PTX-Versuchen wurden die Zellen 6-18 Stunden mit PTX (100-200 ng/ml) präinkubiert. Das Trypsinieren wurde mit der Zugabe von 24 ml 25 mM Glukose-DMEM beendet und die Zellen 4 Minuten bei 1000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 25 ml 0 mM Glukose-DMEM resuspendiert und in ein Becherglas pipettiert. Die suspendierten Zellen wurden in diesem Glas 1,5 Stunden bei 37° C und leichtem Schütteln gehungert. Danach wurden 2×10^6 Zellen zentrifugiert, in 2 ml modifiziertem Krebs Ringer Puffer Hepes (=KRBH) resuspendiert und in eine 1 cm dicke Quartzküvette (Fa. Hellma) pipettiert. Ein kleiner Magnetrührfisch (3 mm) sorgte für eine homogene Zellsuspension. Die Fluorimetrie wurde mit einem Perkin Elmer LS 50 B Fluorimeter und der dazugehörigen Software FL WinLab (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) durchgeführt. Die Schlitzweite an Exzitations- und Emissionsmonochromator wurde

Bisoxonol Membranpotenzial Messung



Zustand nach Applikation von K_{ATP} blockierendem Insulinsekretagogum: Anstieg von $[K]_i$ und Depolarisation der Zelle. Dadurch Einstrom von Bisoxonol in das Zytosol, wo es durch Bindung an Proteine erhöhte Fluoreszenzintensität zeigt.

auf jeweils 10 nm eingestellt und anschließend das Time Drive Programm gestartet. Beim Time Drive Programm wird die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet. 2 μ l von Bisoxonol, einem Dithiobarbitursäurederivat (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) wurde von einer 100 μ M DMSO-Stammlösung zu der 2 ml Zellsuspension hinzugefügt, so daß sich eine Bisoxonol-Endkonzentration von 100 nM einstellte. Bisoxonol wurde bei 540 nm angeregt, die Emission bei 580 nm detektiert. Die Bisoxonolzugabe hatte eine erste Gleichgewichtseinstellung der Fluoreszenzintensität zur Folge, die nach 5 Minuten abgeschlossen war. Anschließend wurde mit einer wäßrigen, konzentrierten Glukosestammlösung eine beliebige (0-25 mM) Glukoseendkonzentration in der Küvette eingestellt. Der Glukosemetabolismus führte zu einer Erhöhung des ATP/ADP Verhältnisses und einer Depolarisation der Zellen. Dies führte zu einer zweiten Gleichgewichtseinstellung der Fluoreszenzintensität die nach 10 Minuten abgeschlossen war. Anschließend wurden die zu untersuchenden Substanzen von DMSO-Stocklösungen in 2 μ l Volumina hinzupipettiert und die Fluoreszenzänderungen aufgezeichnet. Am Ende des Versuchs wurde wäßrige KCl Lösung in einer Endkonzentration von 25 mM hinzugefügt. Da KCl keine Fluoreszenzaktivität besitzt, jedoch Zellen reproduzierbar depolarisiert diente es als Kontrolle für intakte Zellen.



Niedrig Glukosezustand/kein Insulinsekretagogum:
Abnahme von $[K]_i$ und Hyperpolarization der Zelle mit vermehrter
Proteindissoziation und Ausstrom des anionischen Bisoxonols
und dadurch Abnahme der Fluoreszenzintensität.

Abb.2-1: Schematische Darstellung der Bisoxonolverteilung in Abhängigkeit des Membranpotentials in Beta-Zellen.

2.5. Confocale Laserscanning Mikroskopie (=CLSM)

2.5.1. Funktionsweise eines Confokalen Laserscanning Mikroskopes

Beim **CLSM** (confocal laser scanning microscope) handelt es sich um ein Lichtmikroskop, an das eine LSM-Unit (bestehend aus einem Laser- und einem Scanning-Modul) gekoppelt ist. In biologischen Objekten ermöglicht das CLSM in erster Linie die dreidimensionale Untersuchung von anatomischen bzw. physiologischen Fragestellungen auf subzellulärer, zellulärer und histologischer Ebene unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen. Aufgrund der spezifischen optischen Konfiguration können mehrere dünne optische Schnitte durch ein vitales biologisches Objekt gelegt und anhand digitaler Aufbereitung zu einer 3D-Struktur rekonstruiert werden.

Funktionsprinzip: Vom Laser generiertes Licht definierter Wellenlänge gelangt ins Scanning-Modul und wird über zwei galvanometrische Scanspiegel als

beugungsbegrenzter Lichtpunkt durch das Objektiv sequentiell auf das Präparat fokussiert ("Scannen" der Probe). Aus der Fokusebene emittiertes Licht gelangt über den Scanner zu verschiedenen Farbteilern, wo die Fluoreszenzemission wellenlängenspezifisch diskriminiert und pixelweise auf die Detektoren (Photomultiplier) verteilt wird. Über Emissionsfilter kann der gewünschte Wellenlängenbereich der zu detektierenden Photonen zusätzlich eingeschränkt werden. Bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie tragen neben dem emittierten Licht aus der Fokusebene alle Photonen, die ober- und unterhalb der fokalen Ebene emittiert werden, zur Bildentstehung bei. Diese unerwünschte Fluoreszenz hat i.d.R. eine reduzierte Auflösung der Bildinformation zur Folge. Beim CLSM ermöglicht eine variable Lochblende (das sogenannte Pinhole) die ausschließliche Detektion von Licht aus der fokalen Ebene, während alle Photonen, die nicht aus dieser Ebene stammen, wirkungsvoll ausgeblendet werden was dadurch eine hochauflösende Abbildung der Probe erlaubt.

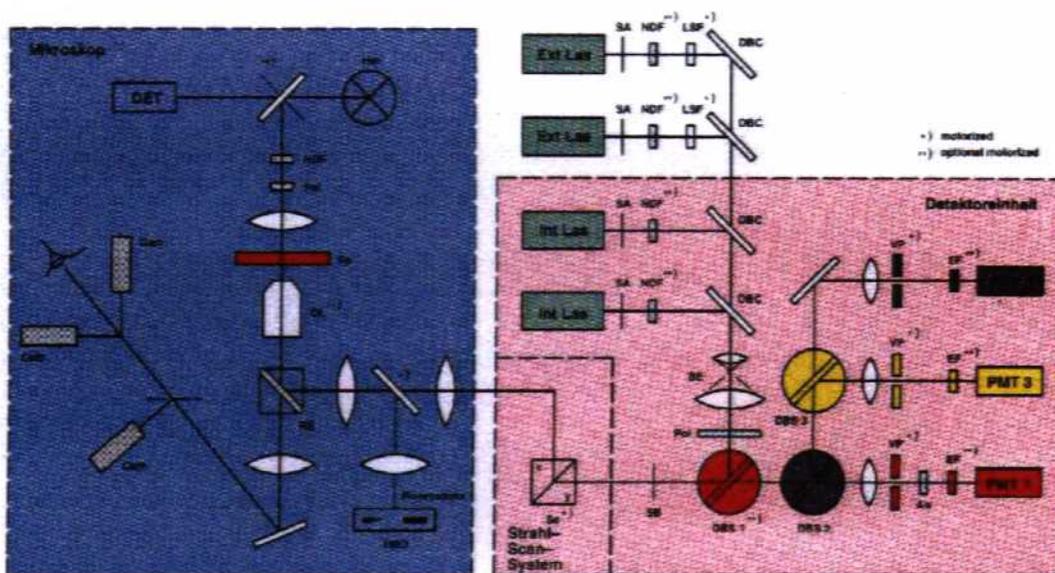


Abb.2-2: Schematisierter Aufbau des Zeiss LSM 410 (nach Zeiss Manual, 1995)

Bei der CLSM wurde ein Leica TCS NT Mikroskop verwendet. Es ist mit folgenden Laserwellenlängen ausgestattet: 351 nm, 364 nm, 458 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm, 543 nm und 633 nm.

2.5.2. Durchführung der CLSM

Es wurden MIN 6 Zellen in suspensierter Form untersucht. Die Zellaufbereitung erfolgte bei Fluoreszenzuntersuchungen ohne Antikörper wie in 'MIN 6 Zelllinie' beschrieben, wobei das Zellpellet in KRBH aufgenommen wurde. Bei Fluoreszenzuntersuchungen mit Antikörpern wurden die Zellen in 4% Paraformaldehyd fixiert und mit 0,01% Triton X100 PBS permeabilisiert.

A) CLSM von BL 11771 und 11778:

Die fluoreszierenden Imidazolinverbindungen wurden in einer Konzentration von 1 $\mu\text{M/l}$ mit der KRBH Zellsuspension 1 Stunde inkubiert und die Zellen im Z-Scan aufgenommen. Die Imidazoline wurden bei 360 nm angeregt, das Emissionsfenster lag zwischen 435 und 480 nm.

B) Überlappung der Imidazoline mit dem Zink-Indikator Newport Green (=NPG):

Der KRBH-Zellsuspension wurde NPG (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in einer Endkonzentration 5 $\mu\text{M/l}$ zugesetzt, um Zn²⁺ Ionen in Insulingranula zu detektieren. Die Zellen wurden mit NPG 60 Minuten bei 37° C und leichtem Schütteln beladen. In den Zellen wurde das nicht fluoreszierende zellmembranpermeable NPG-Acetat durch unspezifische Esterasen hydrolysiert und in die zellmembranimpermeable Form überführt. Danach wurden die Imidazolinverbindungen jeweils wie unter A) beschrieben hinzugefügt. Die Imidazoline wurden bei 360 nm angeregt, das Emissionsfenster lag zwischen 435 und 480 nm. Newport Green wurde bei 514 nm angeregt, das Emissionsfenster lag zwischen 525 und 590 nm.

C) Überlappung der Imidazoline mit dem sekundären, fluoreszenzmarkierten Insulinantikörper CY 3:

Die Zellen wurden in 4% Paraformaldehyd fixiert, zentrifugiert, in 0,01% Triton X100 PBS resuspendiert und permeabilisiert. Die Insulin-Antikörper H-86 (Santa Cruz, California, USA) und Sekundärantikörper CY 3 (Immuno Jackson, USA) wurden in den Konzentrationen wie vom Hersteller angegeben nacheinander

eingesetzt. Die Imidazoline wurden anschließend wie unter A) inkubiert. Die Imidazoline wurden bei 360 nm angeregt, das Emissionsfenster lag zwischen 435 und 480 nm. Der CY 3 Sekundärantikörper wurde mit den Laserwellenlängen 514 und 543 nm angeregt, das Emissionsfenster lag zwischen 560 und 650 nm.

D) CLSM von fluoreszenzmarkiertem Glibenclamid:

Die KRBH-Zellsuspension wurde mit Glibenclamid-FL sowie mit Glibenclamid-TR 60 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem schütteln inkubiert. Die Endkonzentrationen der Sulfonylharnstoffderivate lag jeweils bei 80 $\mu\text{M/l}$.

Die Anregungswellenlänge von Glibenclamid-FL lag bei 488 nm, das Emissionsfenster lag zwischen 520 und 600 nm. Die Anregungswellenlänge von Glibenclamid-TR lag bei 543 nm, das Emissionsfenster lag zwischen 600 und 660 nm.

2.6. Aufnahme von Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzspektren wurden mit dem Perkin Elmer LS 50 B Fluorimeter und entsprechender Software aufgenommen (siehe Bisoxonol-Messung). Die zu untersuchenden Substanzen wurden wenn nicht anders vermerkt in DMSO hochkonzentriert gelöst und in verschiedene wäßrige Lösungen pipettiert. Mit dem Scan Programm wurden dann in den gewünschten Wellenlängenbereichen Anregungsspektren mit fester Emissionswellenlänge und variablen Anregungswellenlängen, sowie Emissionsspektren mit fester Anregungswellenlänge und variablen Emissionswellenlängen aufgezeichnet. Die Schlitzweiten wurden individuell auf die Fluoreszenzintensitäten der Substanzen eingestellt (Minimum 2,8 nm/ Maximum 20 nm).

2.7. MTS-Test auf Zytotoxizität und Zellproliferation

Bei der Prüfung auf Zytotoxizität und Zellproliferation von Imidazolinen wurde ein MTS-Test durchgeführt. Das zugrundeliegende Prinzip ist die enzymatische Umsetzung des Tetrazolium-Derivats MTS durch Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen in ein Formazan-Derivat, das bei 492 nm Wellenlänge absorbiert und dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Herstellen der Lösung: In ein lichtgeschütztes 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 21 ml Dulbecco's PBS-Lösung 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.

Die zu untersuchenden Zellen wurden wie bei dem Insulinfreisetzungsversuch in einer Konzentration von 30000/Loch ausgesät und wuchsen über Nacht nach 24 Stunden adhärent an den Boden der Mikrotiterplatten. Dann erfolgte die Substanzapplikation in jeweiliger 3-Fachbestimmung, wobei Konzentrationsreihen von $100\mu\text{M}$ bis 1 nM pipettiert und 24 Stunden inkubiert wurden. Am Ende der Inkubation wurden 2,0 ml MTS-Lösung und $100\ \mu\text{l}$ PMS-Lösung gemischt und auf einem Schüttelgerät vorsichtig geschüttelt (Promega, Madison, WI, USA). Der Überstand der Zellen wurde abgenommen und $20\ \mu\text{l}$ der MTS/PMS-Lösung in jedes Loch pipettiert. Anschließend wurde für 3 Stunden unter 5% CO_2 und 37°C inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 492 nm in einem MRX Photometer (Dynex, USA) photometrisch bestimmt.

Das Anwachsen ist von Bedeutung, da ein Abkugeln der Zellen allein auch ein Zeichen für toxische Wirkungen sein kann. Zusätzlich zum MTS Test wurde auch die Trypanblaufärbung ausgenutzt um abgestorbene Zellen zu identifizieren. Trypanblau lagert sich in die abgestorbenen Zellen ein und wird aufgrund der nicht mehr funktionierenden Ausschleusmechanismen im Zytosol gespeichert. Der Farbstoff wurde in einer 4%igen Lösung mit dem Volumen des Zellmediums im Verhältnis 1:1 gemischt. Danach wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Zellen mikroskopiert.

2.8. Indirekte Messung von cAMP Konzentrationsänderungen

Hierbei handelt es sich um eine indirekte Meßmethode bei der keine Informationen über die tatsächliche cAMP-Konzentration erhalten wird. Es können aber tendenzielle Veränderungen der cAMP-Konzentration von einer bestimmten Ausgangskonzentration gemessen werden. Die hier verwendeten HEK 293 Zellen wurden mit dem cAMP-abhängigen Promotor und dem Luciferase-Gen transfiziert.

Dieser Promotor erhöht die Luciferase-Expression und seine Aktivität ist durch cAMP induzierbar. Das bedeutet, daß bei hohen cAMP Konzentrationen viel Luciferase gebildet wird und dementsprechend u.g. Reaktion vermehrt abläuft. Dem Luciferase Reporter Gene Assay liegt folgende enzymatische Umsetzung zugrunde:



Oxyluciferin bewirkt normalerweise durch Inhibierung der Luciferase eine schnelle Signalabschwächung. Im hier verwendeten Luciferase Reporter Gene Assay, constant light signal (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wird diese Inhibierung durch die Anwesenheit von Adenosinmonophosphat (AMP) verhindert, was in einer sehr stabilen Lichtemission über einen Zeitraum von mehreren Stunden resultiert.

Protokoll:

Die stabilen, Luciferase-exprimierenden HEK 293 Zellen wurden in 96 Loch Mikrotiterplatten ausgesät und 48 Stunden bei 5% CO₂ und 37° C mit Dulbecco-Medium kultiviert. Danach wurde das Medium gegen 100 µl phenolrotfreies und wirkstoffhaltiges DMEM gewechselt um eine Signalunterdrückung zu vermeiden und 5 Stunden mit den Wirkstoffen inkubiert. Dann wurden 100µl Luciferase-Substratreagenz zu 100 µl der Zellkultur gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit erfolgt die vollständige Lyse der Zellen und die Lichtreaktion beginnt. Anschließend erfolgte die Messung der Biolumineszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge von 562 nm in einem

ELISA Reader (Dynex Technologies). Das Signal bleibt bis ca. 1 Stunde nach Substratreagenzzugabe konstant.

2.9. Messung der Phosphodiesteraseaktivität

MIN 6 Zellen wurden wie folgt aufgearbeitet: adhärenz gewachsene MIN 6 Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde dann abgesaugt und die Zellen über Kopf bei -20°C für 20 Minuten eingefroren. Anschließend wurden die Zellen mit hypoosmolarem Lysispuffer (20 mM Tris/HCl, 0,1 mM PMSF) bei 4°C für 15 Minuten auf einem Schüttler inkubiert und dann mit einem Wischblatt vom Flaschenboden abgekratzt. Die Zellen wurden dann in einem Glashomogenisierer (eng anliegender Stempel) mechanisch zerstört und aufgebrochen. In einer Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) erfolgte bei 4°C und 30 Minuten Dauer die Abtrennung von Zellkernen und nicht aufgebrochenen Zellen. Der daraus erhaltene Überstand entspricht dem proteinhaltigen Zytosol, welcher der quantitativen Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen wurde.

Pipettierprotokoll:

10 μl Assay buffer

10 μl cAMP Lösung (1:400 verdünnt)

10 μl Imidazolinverdünnung (0,1% DMSO Höchstkonzentration, Verdünnungsreihen von 100 μM bis 1nM)

10 μl Zytosollösung

10 μl Aqua bidest.

Nach dem Zusammenpipettieren wurde 10 Minuten bei 37°C im Schüttler inkubiert. Dann wurden 50 μl SPA-Kügelchen Lösung (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) hinzugefügt und 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachfolgend sedimentierten die Kügelchen während einer Stunde. Dann wurden die

Mikrotiterplatten in einem Liquid Scintillation + Luminescence Counter (Wallac, Turku, Finnland) ausgezählt und dadurch der Einfluß der Imidazoline auf die Phosphodiesterase bestimmt.

2.10. Statistik

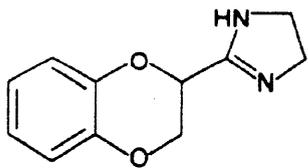
Die statistischen Analysen wurde mit dem Sigma Plot Software Programm (Jandel Scientific Software, S.Raffael, California, USA) durchgeführt. Die Daten zeigen bei den Fehlerbalken die jeweiligen Standardabweichungen des Mittelwertes an. Maximalwerte von Insulinkonzentration, sowie Minimalwerte von Absorption, Biolumineszenz und Counts pro Minute nach Applikation von Wirkstoffen wurden durch den t-Test nach Student analysiert und die Unterschiede zwischen zwei Punkten wurden bei $P < 0,01$ als signifikant betrachtet. EC_{50} Werte wurden mit der Regressionswizzardfunktion berechnet.

2.11. Chemikalien

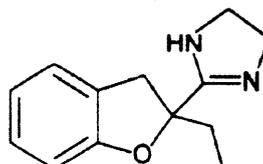
Alle verwendeten Chemikalien wurden nach den jeweiligen aktuellen Vorschriften der Hersteller behandelt und dementsprechend entsorgt. Dabei wurden alle angegebenen R- und S- Sätze beachtet und eingehalten. Organische Lösungen wurden in entsprechenden Sammelbehältern nach Schadstoffkategorien getrennt.

Bei dem Arbeiten mit biologischem Zellmaterial der Sicherheitstufe 1 wurden ebenfalls die aktuellen Vorschriften der Behörden überprüft und eingehalten. Biologisches Material und damit kontaminierte Arbeitsmaterialien wurden nach dem Gebrauch autoklaviert. Lösungen mit kanzerogenen oder mutagenen Stoffen wurden dem Sondermüll zugeführt. Gentechnische Arbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 der Abteilung Molekularbiologie der Lilly Forschung GmbH, Hamburg durchgeführt. Dieses Unternehmen ist bei der Hansestadt Hamburg in der Umweltbehörde im Amt für Technik und Umweltschutz registriert.

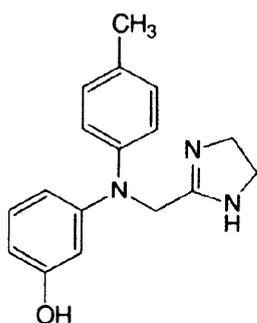
2.12. Strukturformeln



Idazoxan



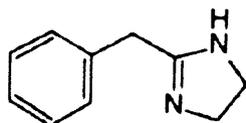
Efaroxan



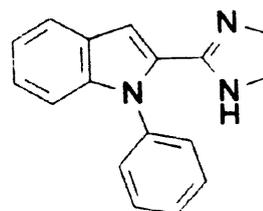
Phentolamin



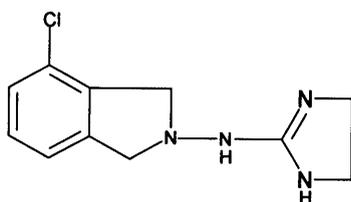
Midaglizol



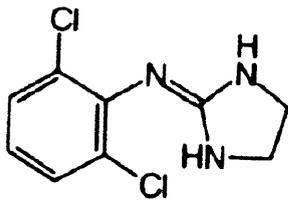
Tolazolin



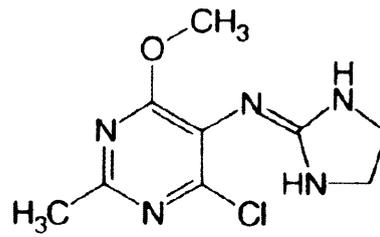
RX 871024



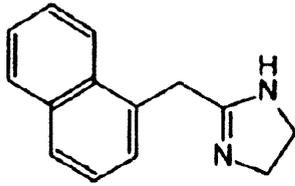
BDF 6143



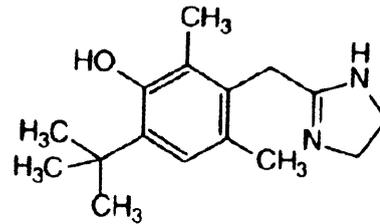
Clonidin



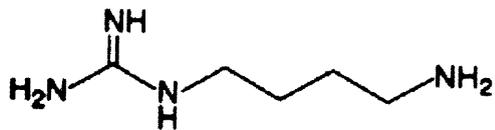
Moxonidin



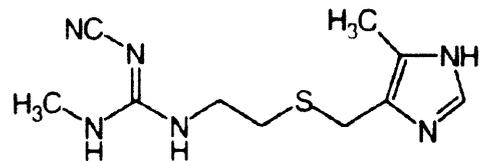
Naphazolin



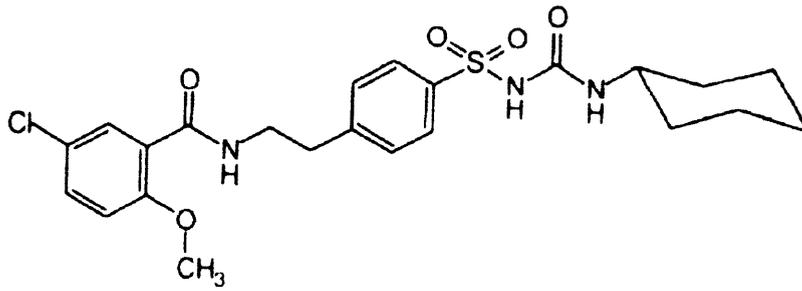
Oxymetazolin



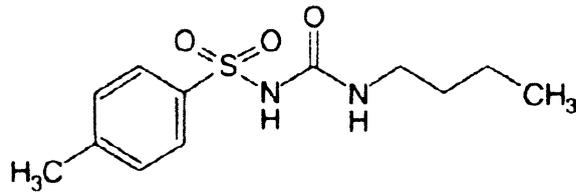
Agmatin



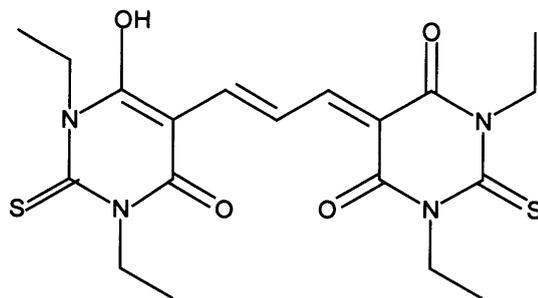
Cimetidin



Glibenclamid



Tolbutamid



Bisoxonol (DiSBAC2(3))

3. Ergebnisse

3.1. Insulinfreisetzungsversuche

3.1.1. Glukose-abhängige Insulinfreisetzung durch Imidazoline

Die Imidazolinverbindungen BL 11771 und BL 11345 wurden auf Glukose-abhängige Insulinfreisetzung untersucht. Gemäß Standardprotokoll wurden MIN 6 Zellen 1 Stunde in 0 mM Glukose-EBSS Puffer gehungert. Anschließend wurde der Hungerphasen-Puffer verworfen und durch Imidazolinhaltigen Puffer ersetzt, wobei im einen Fall mit 25 mM Glukose, im anderen Fall mit 0 mM Glukose inkubiert wurde. Beide Verbindungen zeigten in Anwesenheit von 25 mM Glukose eine statistisch signifikante Erhöhung der Insulinfreisetzung im Vergleich zur Basalsekretion von 25 mM Glukose alleine. In Abwesenheit von Glukose fand hingegen keine signifikante Steigerung der Insulinfreisetzung statt. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Glukose-abhängigen Insulinfreisetzung wurden auch mit BL 11778 und BL 11282 erhalten (Daten nicht gezeigt).

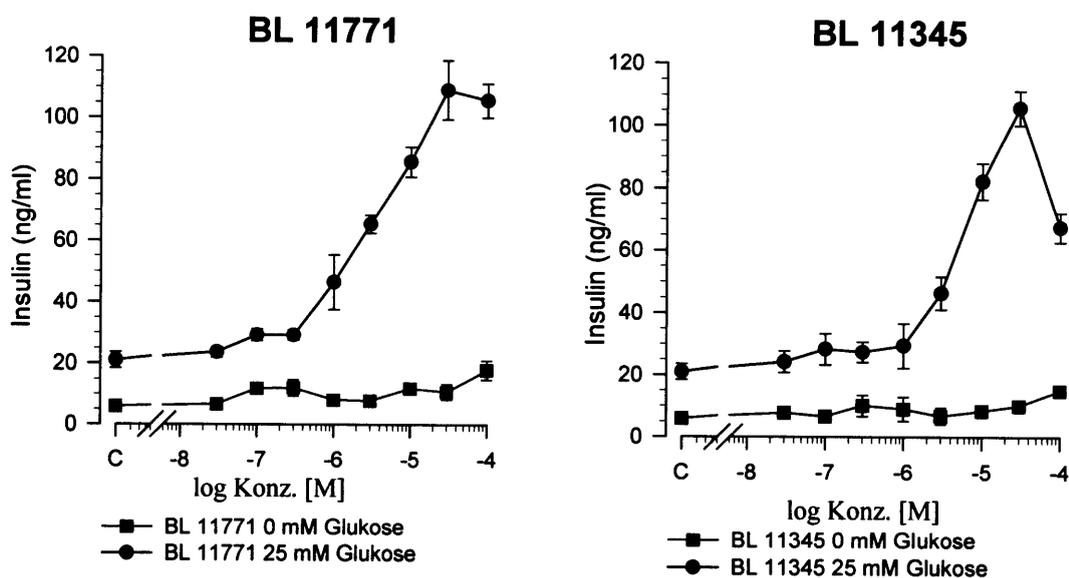


Abb.3-1: MIN 6 Zellen wurden 1 h gehungert und anschließend 1 h mit den jeweiligen Imidazolinen entweder bei 25 mM oder 0 mM Glukose inkubiert. Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 4 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

3.1.2. Glukose-unabhängige Insulinfreisetzung durch Sulphonylharnstoffe

Die Sulphonylharnstoffe Tolbutamid und Glibenclamid zeigten bei der Untersuchung der Insulinfreisetzung sowohl bei 25 mM als auch bei 5 mM und 0 mM Glukose eine signifikante stimulierende Wirkung im Vergleich zur jeweiligen Basalsekretion.

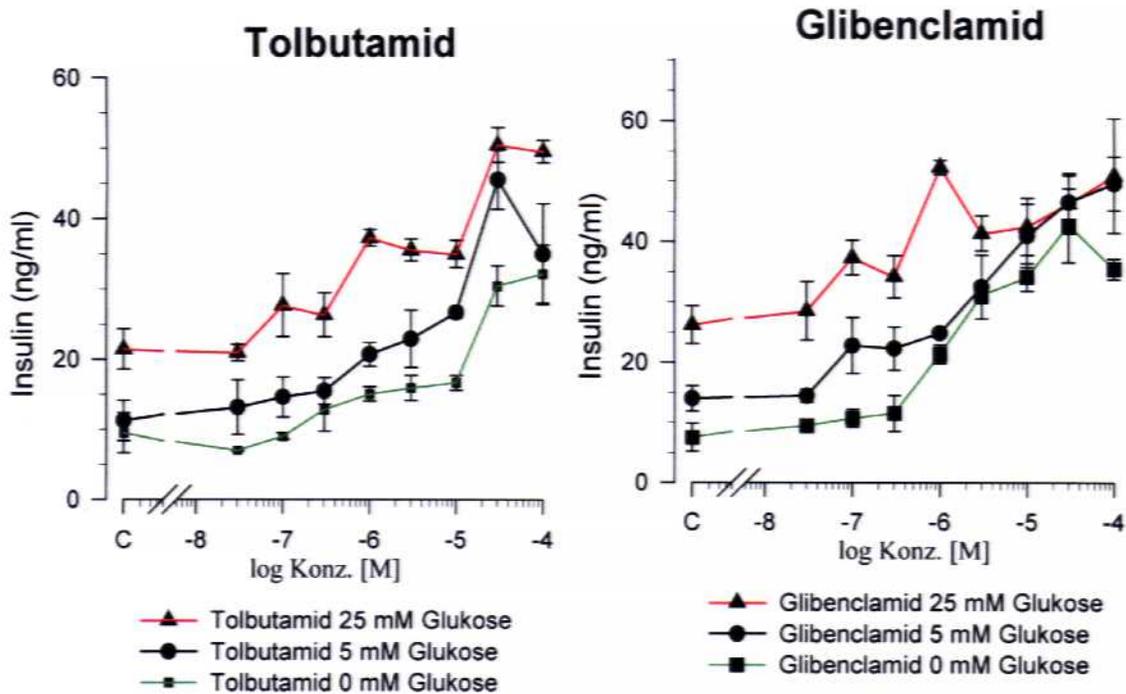


Abb.3-2: Die Sulfonylharnstoffe Tolbutamid und Glibenclamid wurden in MIN 6 Zellen wie unter Abb.3-1 appliziert. Jedem Meßpunkt liegt $n=3$ zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte \pm SEM.

3.1.3. Kombinierte Applikation von Imidazolinen

Die kombinierte Applikation von dem Naphtholimidazolin BL 11771 und dem Indolimidazolin BL 11345 zeigte keine erhöhte maximale Insulinfreisetzung in MIN 6 Zellen. Die maximale Insulinfreisetzung lag für BL 11771 bei 109 ng/ml, SEM 9,5 für BL 11345 lag sie bei 106 ng/ml, SEM 5,5 und für BL 11771 kombiniert mit BL 11345 lag sie bei 118 ng/ml, SEM 0,9. Dieser fehlende additive Effekt kann nicht durch komplette Entleerung der vorhandenen Insulingranula erklärt werden, weil Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (=PMA) Behandlung von MIN 6 Zellen bei gleichem Hunger- und Inkubationsschema zu einer im Vergleich zur kombinierten

Imidazolinbehandlung statistisch signifikant erhöhten Insulinfreisetzung führte (620,8 ng Insulin/ml, n=9. Außerdem konnte BL 11771 konzentrationsabhängig die Insulinfreisetzung in MIN 6 Zellen mit fest eingestellter PMA Konzentration von 20 nM additiv steigern (Abb.3-4).

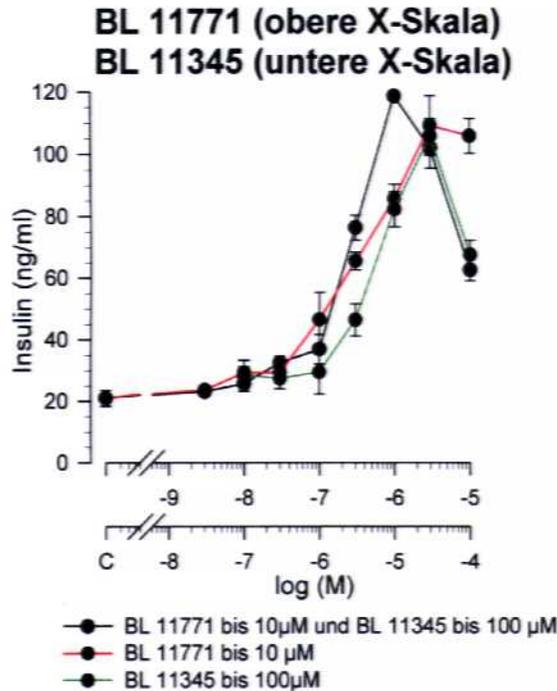


Abb.3-3: MIN 6 Zellversuch wie in Abb.3-1. Zusätzlich zur separaten Imidazolinapplikation wurden hier noch die beiden Verbindungen kombiniert appliziert, wobei die jeweiligen Konzentrationen den beiden X-Achsen zu entnehmen ist. Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

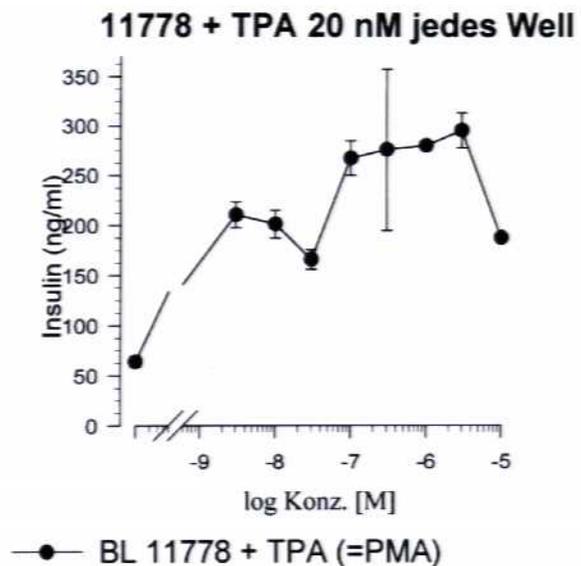
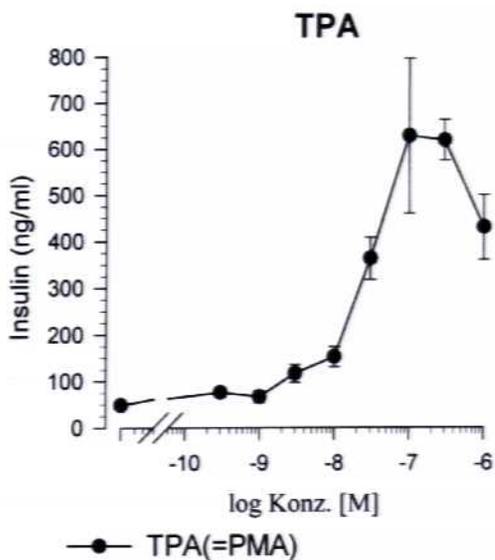
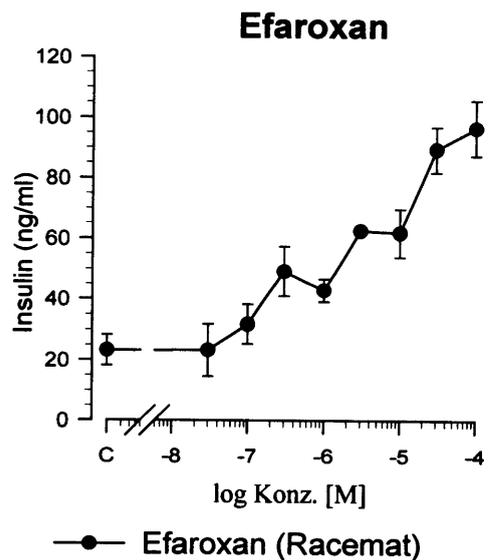
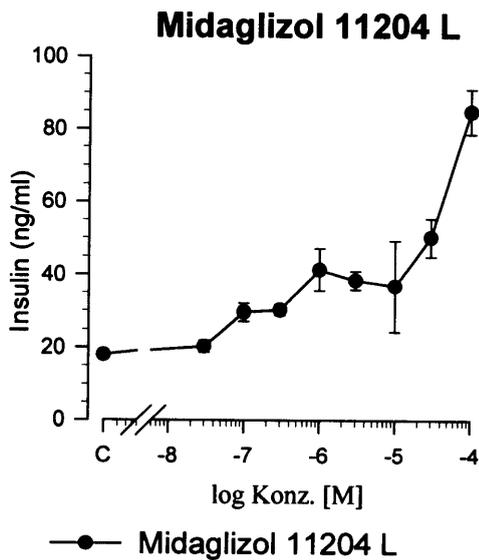
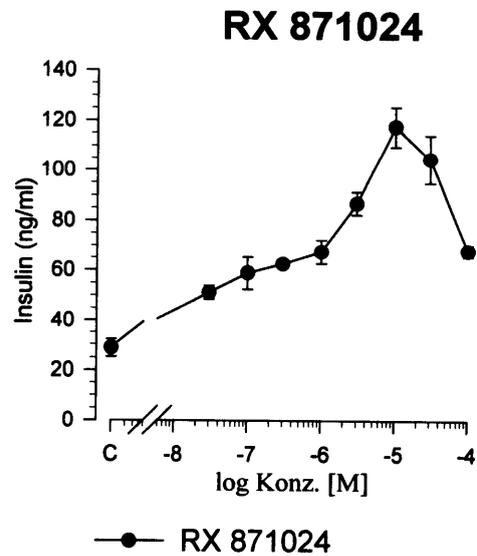
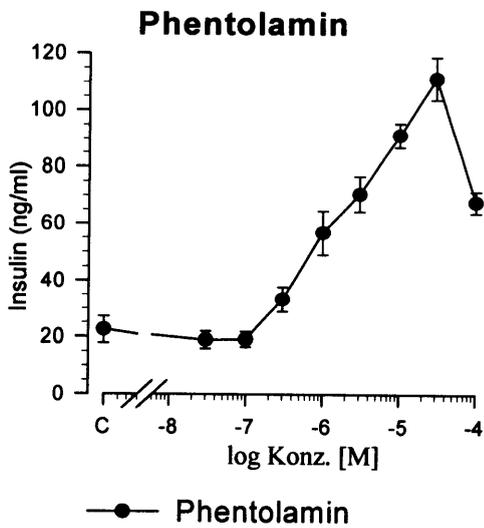


Abb.3-4: MIN 6 Zellen wurden 1 h gehungert und anschließend 1 h bei 25 mM Glukose mit TPA(=PMA) bzw. BL 11778 und fester Konzentration TPA 20 nM inkubiert. Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

3.1.4. Insulinfreisetzung bei 25 mM Glukose durch verschiedene Imidazoline und Guanidinderivate

Die Applikationen von verschiedenen in der Literatur beschriebenen Imidazolinen und Guanidinderivaten bei 25 mM Glukose zeigten in MIN 6 Zellen die in den Abb.3-5 und Abb.3-6 dargestellten Kurven der Insulinfreisetzung.



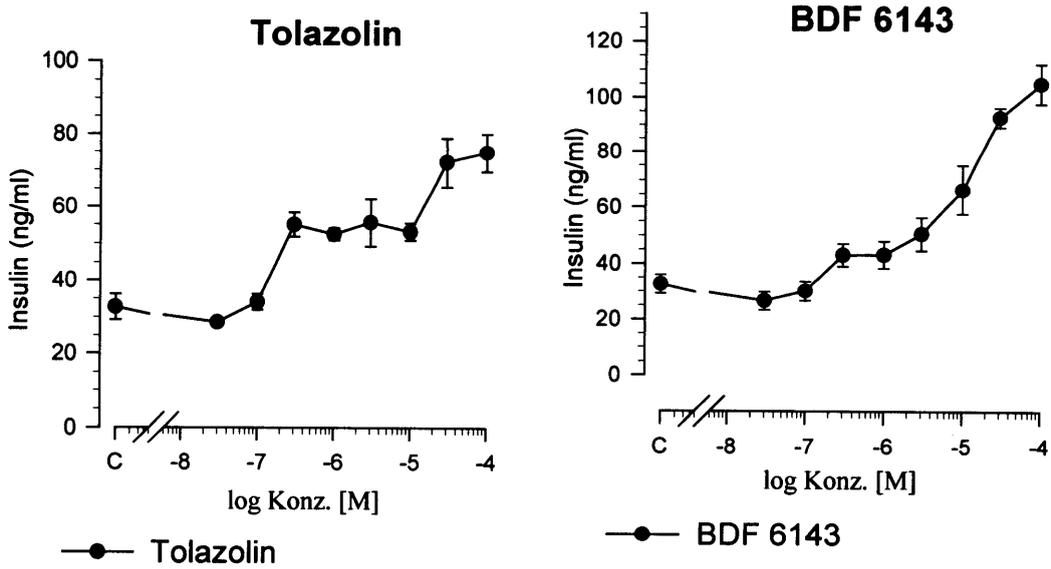


Abb.3-5: Verschiedene Imidazolinverbindungen im Standard-Freisetzungsversuch mit 1 h Hungern und anschließender Imidazolininkubation bei 25 mM Glukose. Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

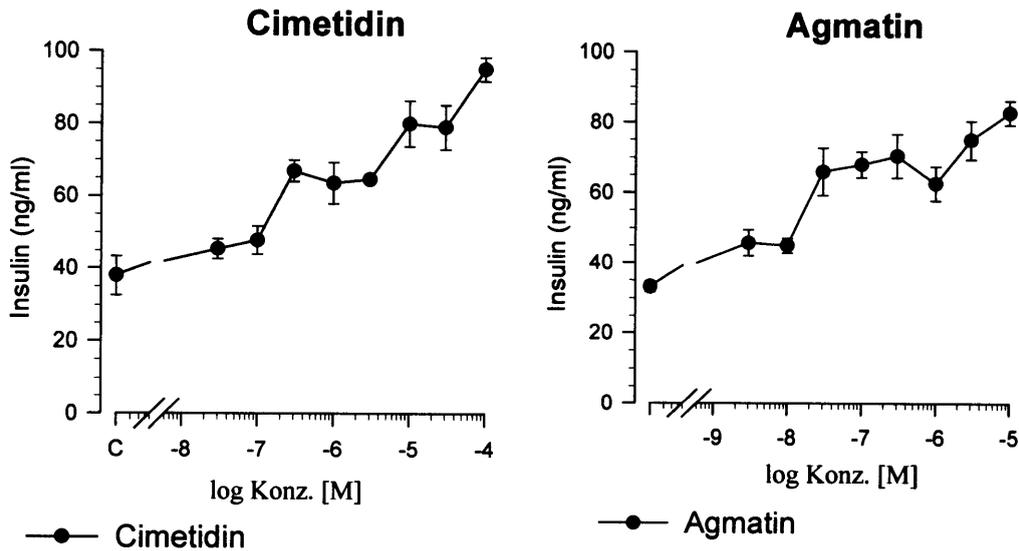


Abb.3-6: Die Guanidinderivate Cimetidin und Agmatin im Standard-Freisetzungsversuch mit 1 h Hungern und 1 h Substanzinkubation bei 25 mM Glukose. Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

3.1.5. Desensibilisierungsversuche mit Efaroxan und BL 11778

MIN 6 Zellen zeigten nach 18 stündiger Präinkubation mit den Imidazolin Efaroxan und BL 11778 deutliche Desensibilisierungserscheinungen (Abb.3-7). Es zeigte sich, daß eine in der Präinkubationsphase verwendete Verbindung auch die Wirksamkeit einer anderen Imidazolinverbindung in der nachfolgenden Stimulationsphase verringerte. So führte beispielsweise die Präinkubation mit Efaroxan zu einem Wirkverlust sowohl von BL 11345 als auch von BL 11771.

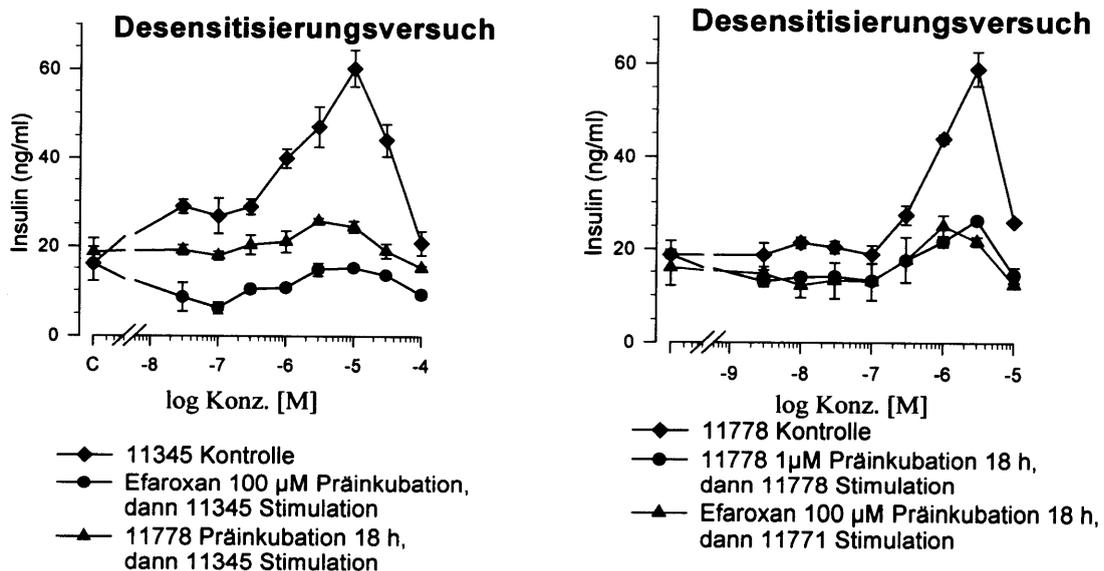


Abb.3-7: MIN 6 Zellen wurden 18 Stunden mit den angegebenen Substanzen und normalem DMEM Wachstumsmedium inkubiert. Anschließend erfolgten 1 h Hungerphase und danach 1 h 25 mM Glukoseinkubation mit den jeweils angegebenen Imidazolin. Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 4 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

3.1.6. Abhängigkeit der Imidazolinwirkung von der Ca^{2+} Konzentration

Das Naphtholimidazolin BL 11778 und das Indolimidazolin BL 11345 zeigten eine deutliche Abhängigkeit ihrer Wirkungen von der Ca^{2+} Konzentration im extrazellulären Medium (Abb.3-8). Eine Erniedrigung der physiologischen Ca^{2+} Konzentration von 1,8 mM auf 1,8 µM resultierte bei BL 11345 bereits in einer Erniedrigung der maximalen Insulinfreisetzung von 120 ng Insulin/ml auf 25 ng Insulin/ml sowie einer Erniedrigung der Basalstimulation von 35 ng Insulin/ml auf

7 ng Insulin/ml. Bei BL 11778 kam es auch jeweils zu einer Reduktion der Freisetzung auf $\sim 1/5$ im Vergleich zu physiologischen 1,8 mM Ca^{2+} . Unter den o.g. Bedingungen fand die Glukose- und Imidazolinstimulation zeitgleich statt. Der Glukosemetabolismus unter Normalbedingungen von extrazellulär 1,8 mM Ca^{2+} führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Deshalb könnte man die o.g. Reduktionen der Insulinfreisetzung bei extrazellulär 1,8 μM Ca^{2+} auf das verringerte Ca^{2+} -Konzentrationsgefälle und den dadurch verringerten Ca^{2+} -Einstrom während der 25 mM Glukose- und Imidazolinstimulation zurückführen.

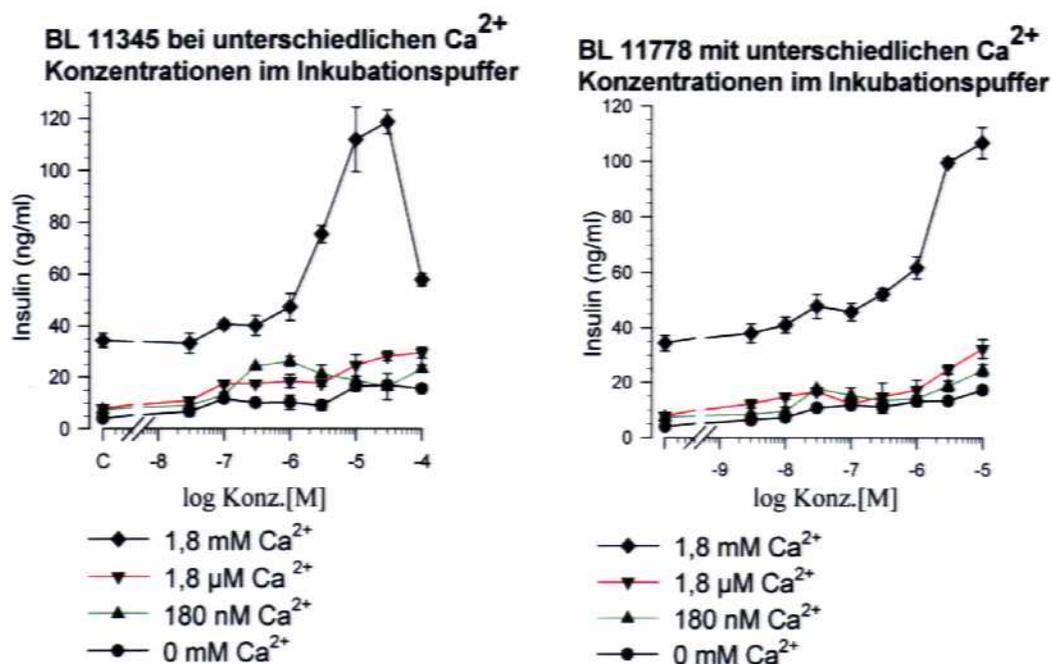


Abb.3-8: MIN 6 Zellen wurden in 1,8 mM Ca^{2+} und 0 mM Glukose-EBSS gehungert. Die 25 mM Glukose- und Imidazolinstimulation erfolgte in EBSS mit unterschiedlich eingestellten Ca^{2+} Konzentrationen. 2 mM EGTA wurde bei 0 mM Ca^{2+} zugesetzt um evtl. Ca^{2+} Verunreinigungen abzupuffern. Jedem Meßpunkt liegt $n=3$ zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte \pm SEM.

In einem modifizierten Versuch wurden MIN 6 Zellen 1 Stunde gehungert, dann bei 25 mM Glukose, 1,8 mM Ca^{2+} und zunächst ohne Imidazolin 1 Stunde inkubiert. Danach wurde das Medium gewechselt auf 25 mM Glukose, 0 mM Ca^{2+} sowie die jeweilige Imidazolinverbindung. Bei dieser Reihenfolge konnte während der Glukosestimulationsphase Ca^{2+} in die Zellen einströmen. Durch den nachfolgenden Wechsel auf 0 mM Ca^{2+} im extrazellulären Medium kam es jedoch zu deutlichen

Reduktionen der Imidazolin-induzierten Insulinfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle bei der während allen Inkubationsphasen 1,8 mM Ca^{2+} im Medium anwesend war (Abb.3-9). Dieses Experiment zeigt die Notwendigkeit der Präsenz von 1,8 mM Ca^{2+} während sämtlicher Inkubationsschritte um eine volle insulinfreisetzende Wirkung von Imidazolinen zu erreichen.

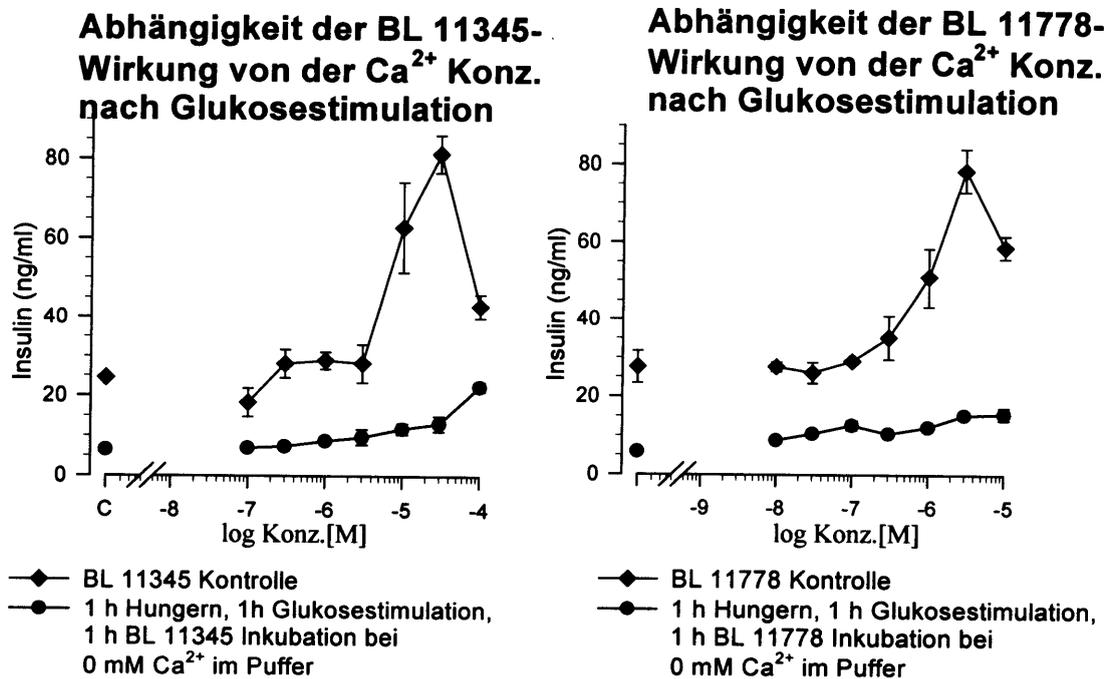


Abb.3-9: MIN 6 Zellen wurden 1 h gehungert, 1 h bei 25 mM Glukose inkubiert, dann weiterhin bei 25 mM Glukose jedoch 0 mM Ca^{2+} sowie der jeweiligen Imidazolinverbindung inkubiert. Bei der Kontrolle erfolgten die o.g. Schritte, es wurde aber immer mit 1,8 mM Ca^{2+} inkubiert. Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 4 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

3.1.7. Additive Insulinfreisetzung zur KCl-Stimulation durch BL 11771

MIN 6 Zellen wurden mit 25 mM KCl depolarisiert. Das hatte eine erhöhte Insulinausschüttung zur Folge (Abb.3-10). Die zusätzlich zu 25 mM KCl erfolgte Applikation von BL 11771 in ansteigenden Konzentrationen führte zu einem konzentrationsabhängigen und additiven Effekt hinsichtlich der Insulinfreisetzung (Abb.3-11). Die Wirkung von BL 11771 war in diesem Fall nicht auf eine Zelldepolarisation zurückzuführen, da 25 mM KCl bereits den maximalen durch eine Depolarisation zu erreichenden insulinfreisetzenden Effekt erzeugte.

KCl 2,5 bis 25 mM

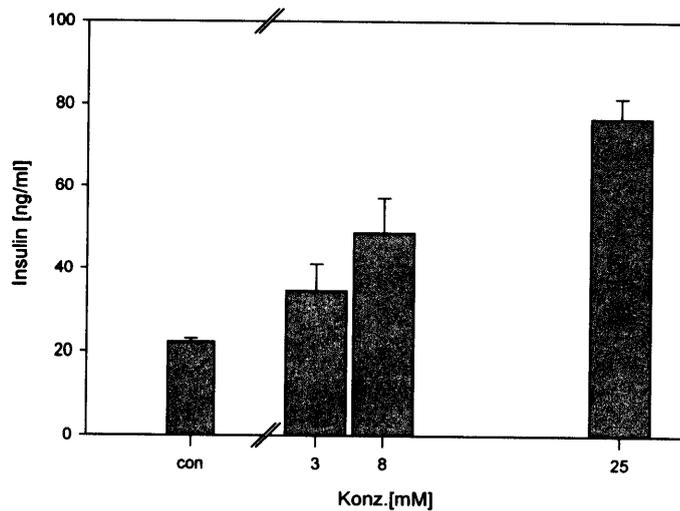


Abb.3-10: MIN 6 Zellen wurden 1 h gehungert und anschließend 1 h bei 25 mM Glukose und den angegebenen KCl Konzentrationen inkubiert, wobei im Puffer und somit auch in der Kontrolle bereits 5,4 mM KCl enthalten waren. Jedem Meßpunkt liegt $n=3$ zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungsbeziehung eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentiert. Durchschnittswerte \pm SEM.

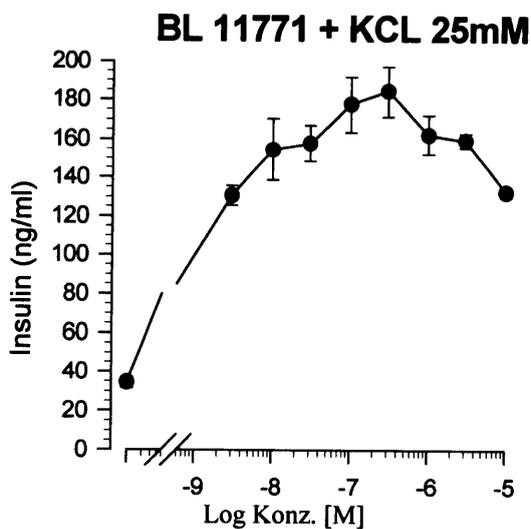


Abb.3-11: MIN 6 Zellen wurden 1 h gehungert. Danach erfolgte für 1 h Inkubation bei 25 mM Glukose sowie BL 11771 und 25 mM KCl. Jedem Meßpunkt liegt $n=3$ zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurve eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentiert. Durchschnittswerte \pm SEM.

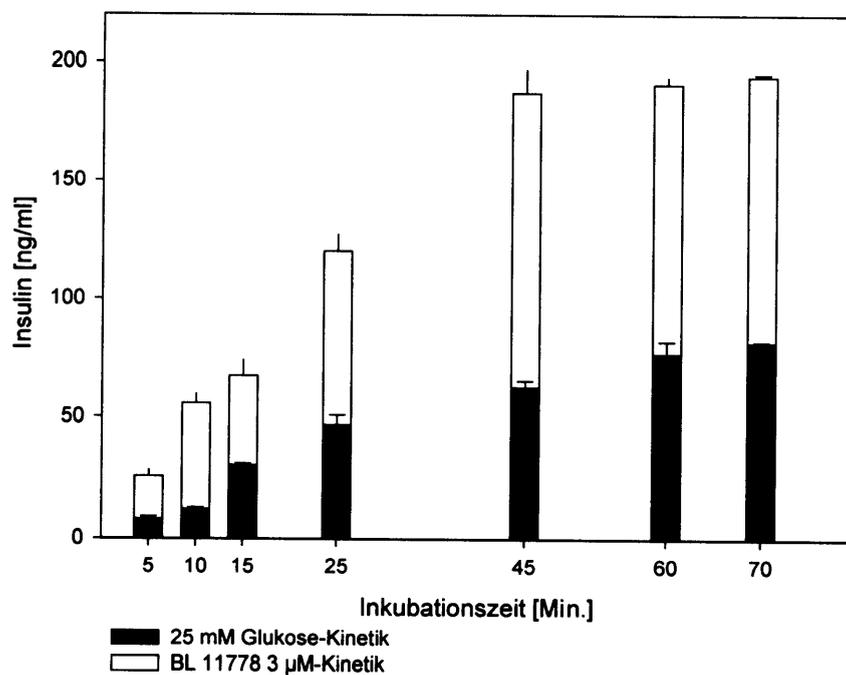
—●— BL 11771 mit je 25 mM KCl

3.1.8. Insulinfreisetzungskinetik von Imidazolinen und Glukose

Um die optimale 25 mM Glukose- und Imidazolininkubationsdauer in MIN 6 Zellen zu finden wurden die Inkubationszeiten nach der einstündigen Hungerphase variiert. Dabei zeigte sich, daß nach einer Stunde Stimulationsphase bereits die größte Menge

an Insulin ausgeschüttet wurde. 70 Minuten Inkubationszeit führten zu keiner statistisch signifikanten Erhöhung gegenüber 60 Minuten Inkubationszeit (Abb.3-12 A). Analog zu dem Versuch mit variierenden Ca^{2+} -Konzentrationen war auch hier die Frage nach der Bedeutung des Glukosemetabolismus im Zusammenhang mit der glukoseabhängigen Imidazolinwirkung von Interesse. Da der Glukosemetabolismus allein betrachtet durch die Erhöhung des ATP/ADP Verhältnisses zu einer Zelldepolarisation, Ca^{2+} -Einstrom und Insulinexozytose führt war fraglich, ob eine zunächst alleinige 25 mM Glukosestimulation die anschließenden Imidazolininkubationszeiten für eine maximale Insulinfreisetzung verändern würden. MIN 6 Zellen wurden für die Klärung dieser Frage 1 Stunde gehungert, anschließend 1 Stunde nur mit 25 mM Glukose stimuliert und dann bei weiterhin 25 mM Glukose mit der jeweiligen Imidazolinverbindung inkubiert. Die Imidazoline BL 11771 und BL 11282 zeigten bei diesem modifizierten Versuch keine signifikante Änderung der Inkubationsdauer für eine Maximalfreisetzung (Abb.3-12 B). Beide Verbindungen mußten für die größtmögliche Insulinfreisetzung 60 Minuten inkubiert werden, wie unter Normalbedingungen auch. Das bedeutet, daß neben einer dauerhaften Ca^{2+} -Konzentration von 1,8 mM die Imidazolininkubationszeit von 60 Minuten notwendig ist um die maximale Insulinsekretion zu gewährleisten.

A Insulinfreisetzungskinetik Glukose/BL 11778



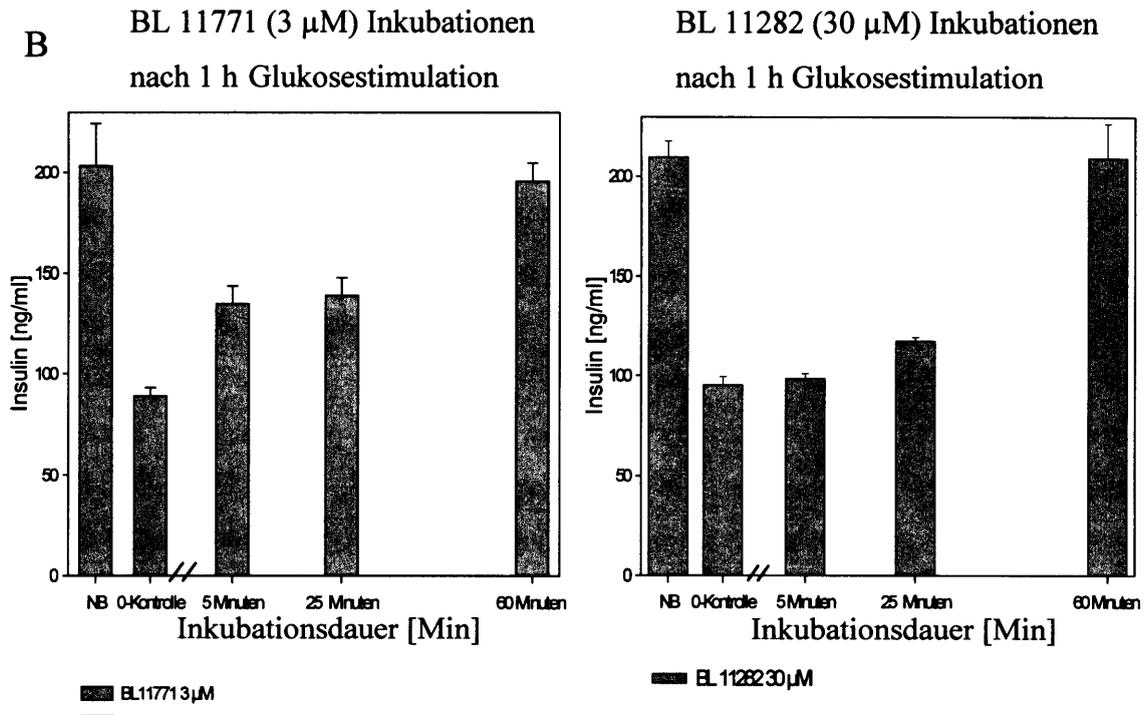


Abb.3-12: A) MIN 6 Zellen wurden 1 h gehungert und anschließend bei 25 mM Glukose oder bei 25 mM Glukose in Kombination mit BL 11778 3 μ M bei unterschiedlicher Dauer inkubiert. B) MIN 6 Zellen wurden nach der Hungerphase 1 h bei 25 mM Glukose stimuliert. Dann wurden die Imidazoline zum 25 mM Glukose-EBSS Medium hinzupipettiert und unterschiedlich lange weiter inkubiert. Jedem Meßpunkt (Meßbalken) liegt n=3 zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

3.1.9. Präinkubationsversuche mit Imidazolinen

Wenn die Imidazolinverbindungen nur am Ende der Hungerphase 1 bis 20 Minuten mit MIN 6 Zellen in Kontakt standen, anschließend 3x mit EBSS gewaschen und dann 1 Stunde mit 25 mM Glukose-EBSS inkubiert wurden, resultierte daraus eine statistisch signifikante Erhöhung der Insulinfreisetzung wie auch bei den Standardfreisetzungsversuchen. Im Falle von BL 11771, BL 11778 und BL 11345 führte eine einminütige Präinkubation bei einer Konzentration von 10 μ M bzw. 100 μ M zu höheren Insulinfreisetzungen als bei den NB-Standardexperimenten (Abb.3-13). Die Verbindung BL 11778 hatte bei der Präinkubationsapplikation bis 100 μ M im Vergleich zum Standardfreisetzungsversuch, bei der die Substanz eine

Stunde mit den MIN 6 Zellen in Kontakt stand einen statistisch signifikant geringeren Abfall der Insulinfreisetzung bei hohen applizierten Konzentrationen (Abb. 3-14).

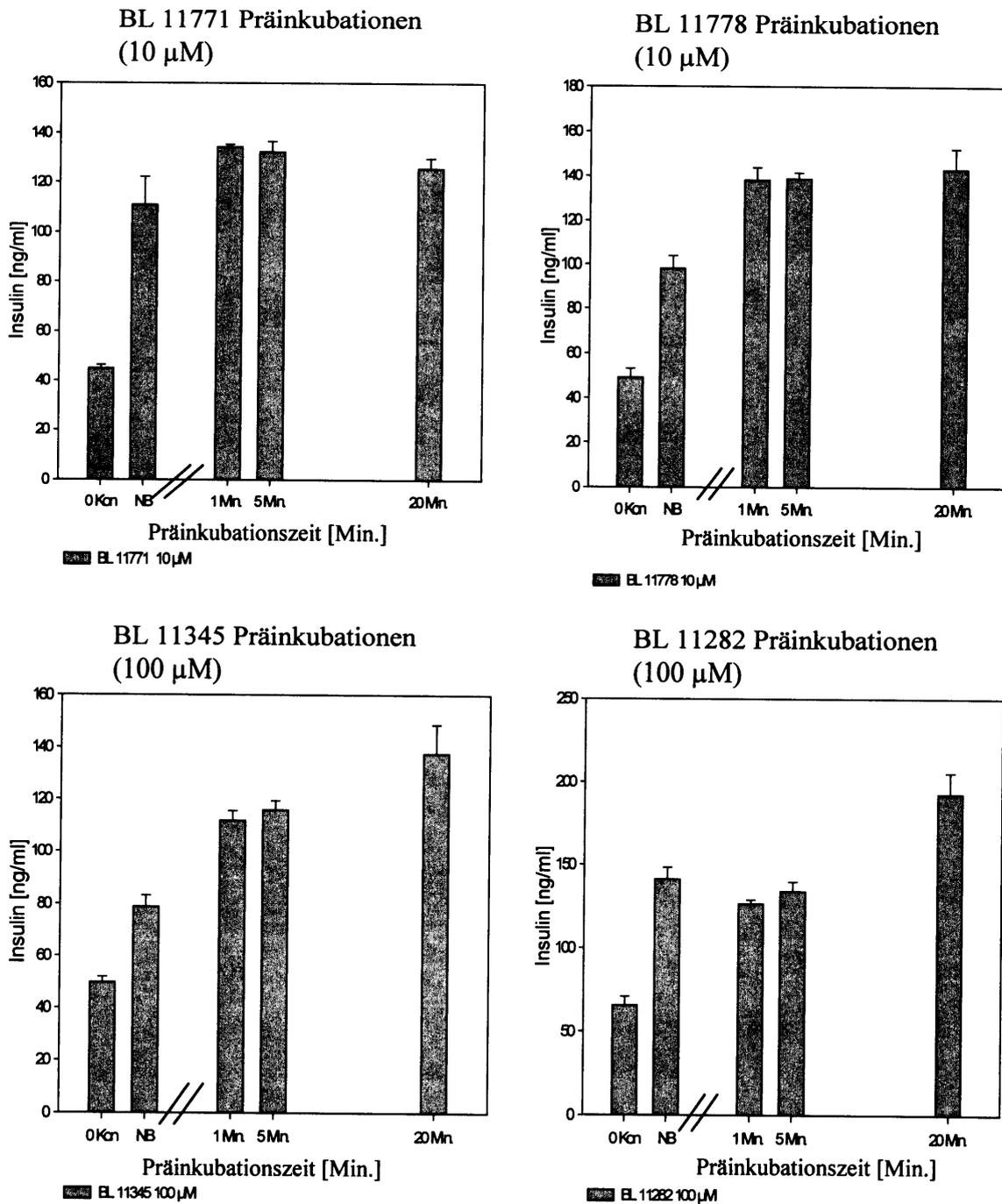


Abb.3-13: MIN 6 Zellen wurden am Ende der Hungerphase für 1 Minute bzw. 20 Minuten mit den jeweiligen Imidazolin in der angegebenen Endkonzentration inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3x mit EBSS gewaschen und danach 1 h bei 25 mM Glukose inkubiert. Bei der 0-Kontrolle wurden keine Imidazoline inkubiert und bei NB waren die Imidazoline wie unter Normalbedingungen 1 h mit den Zellen während der 25 mM Glukosestimulation in Kontakt. (weiter nächste Seite)

Jedem Meßpunkt (Meßbalken) liegt $n=3$ zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte \pm SEM.

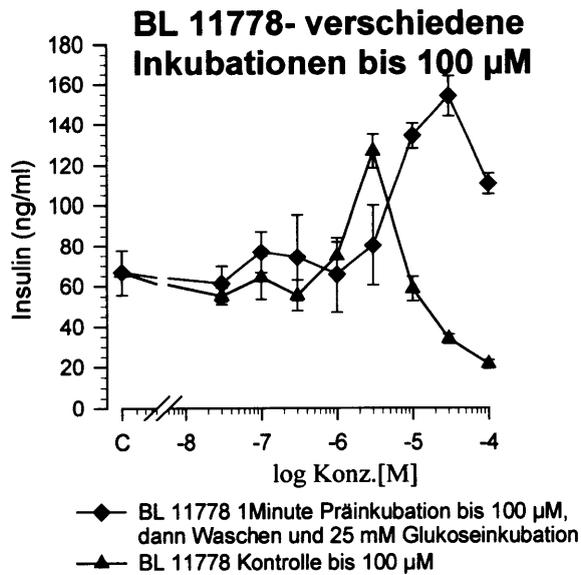


Abb.3-14: MIN 6 Zellen wurden am Ende der Hungerphase 1 Minute mit BL 11778 bis 100 μ M inkubiert. (In allen anderen Versuchen mit diesem Imidazolin nur bis 10 μ M). Danach wurden die Zellen 3x mit EBSS gewaschen und anschließend 1 h bei 25 mM Glukose inkubiert. Bei der Kontrolle war die Substanz wie immer unter Standardbedingungen 1 Stunde bei 25 mM im Zellmedium anwesend. Jedem Meßpunkt liegt $n=3$ zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte \pm SEM

3.1.10. Einfluß von alpha-2 Agonisten auf die Insulinfreisetzung

Ursprünglich wurde der insulinfreisetzende Effekt von Imidazolinen wie z.B. Phentolamin durch deren alpha-2 blockierende Wirkung begründet. Diese Auffassung wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen aufgegeben, weil auch Imidazoline ohne alpha-2 blockierende Wirkung Insulin freisetzen. Es ist aber unbestritten, daß Alpha-2 Agonismus zu einer Sekretionsminderung führt. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene alpha-2 Agonisten bezüglich Insulinfreisetzung untersucht. Clonidin und Moxonidin, alpha-2 Agonisten mit Imidazolinstruktur führten zu einer signifikanten Reduktion der Insulinfreisetzung. Dieser Effekt wurde durch zeitgleiche Applikation von 100 μ M Phentolamin in eine gesteigerte, konzentrationsabhängige Insulinfreisetzung umgekehrt. Ebenso führte eine Präinkubation von MIN 6 Zellen mit Pertussis Toxin (=PTX) zu einer Umkehrung des inhibitorischen Effektes. PTX reagiert mit G_i Proteinen von alpha-2 Rezeptoren und führt durch ADP-Ribosylierung zur Inaktivierung dieser Rezeptoren. Ein weiterer Versuch mit den o.g. Substanzen wurde in Kombination mit dem alpha-2 blockierenden Alkaloid Yohimbin durchgeführt. Yohimbin führte allein appliziert zu einer signifikanten Erhöhung der Insulinsekretion (Abb.3-18). Yohimbin wurde in einer festen Konzentration von

100 μ M mit Clonidin bzw. Moxonidin in ansteigenden Konzentrationen kombiniert mit MIN 6 Zellen inkubiert. Hier zeigten beide alpha-2 Agonisten auch eine Wirkungsumkehr mit konzentrationsabhängiger Wirkung.

Oxymetazolin und Naphazolin sind zwei unselektive alpha-Agonisten mit Imidazolinstruktur. Ihre Applikation führte ebenso zu einer Reduktion der Insulinfreisetzung. Präinkubation mit PTX resultierte wie bei den selektiven alpha-2 Agonisten zu einer Wirkungsumkehr mit einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Insulinfreisetzung. Das physiologische R-Adrenalin zeigte durch alpha-2 Agonismus wie die o.g. Substanzen eine Reduktion der Insulinfreisetzung. Bei R-Adrenalin wurde im Gegensatz zu den unselektiven alpha und selektiven alpha-2 Agonisten mit Imidazolinstruktur nach PTX Präinkubation keine Wirkungsumkehr mit signifikant erhöhter Insulinfreisetzung, sondern eine Aufhebung des inhibitorischen Effektes hinsichtlich der Insulinfreisetzung beobachtet.

Die Ursachen für den stimulierenden Effekt der Substanzen mit Imidazolinstruktur bei Ausschaltung von alpha-2 Rezeptoren wird unter Kap.3.2.3. beleuchtet.

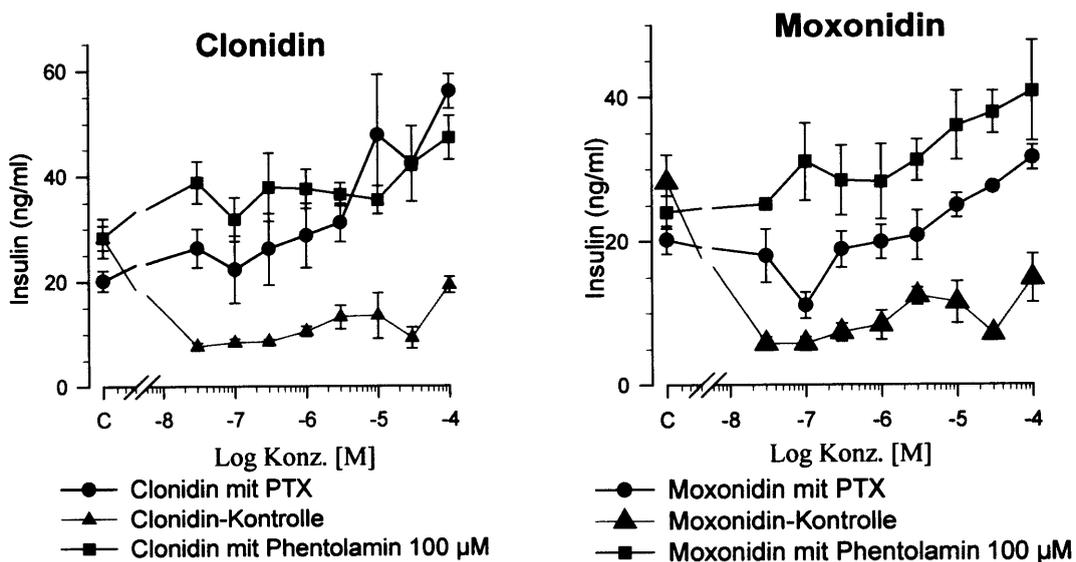


Abb.3-15: MIN 6 Zellen wurden im Kontrollversuch 1 h gehungert und anschließend 1 h bei 25 mM Glukose mit dem jeweiligen alpha-2 Agonisten inkubiert. Die Pertussis Toxin (=PTX) -Versuche wurden nach 18 stündiger Präinkubation der Zellen mit 100 ng/ml PTX nach Kontrollbedingungen mit den alpha-2 Agonisten (weiter auf der nächsten Seite)

durchgeführt. Im jeweils dritten Versuch wurde nach der Hungerphase der jeweilige alpha-2 Agonist mit 100 μ M Phentolamin bei 25 mM Glukose inkubiert. Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

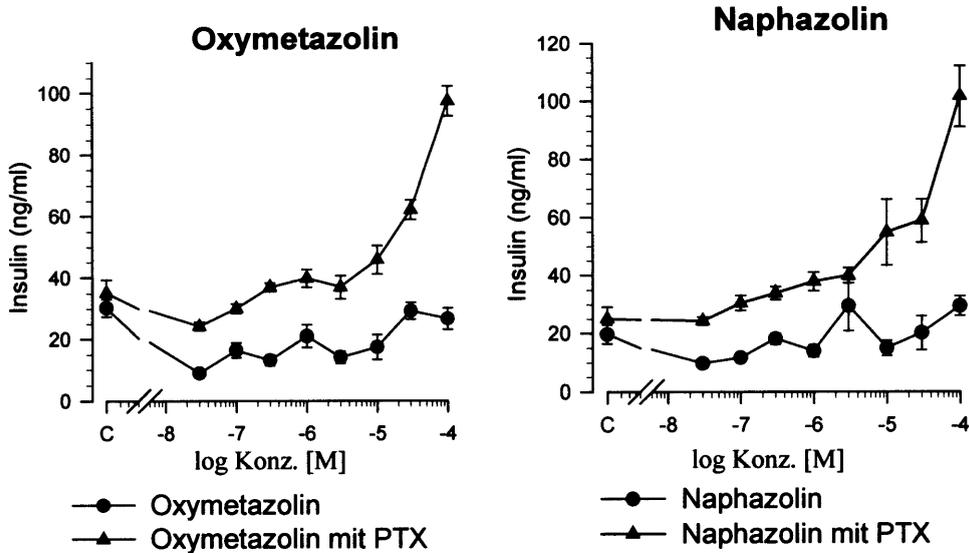


Abb.3-16: MIN 6 Zellen wurden im ersten Versuch unter Standardbedingungen mit dem jeweiligen alpha-Agonisten inkubiert. Im zweiten Versuch wurden die Zellen mit 100 ng/ml Pertussis Toxin (=PTX) 18 h präinkubiert und anschließend standardmäßig mit den alpha-Agonisten inkubiert. Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

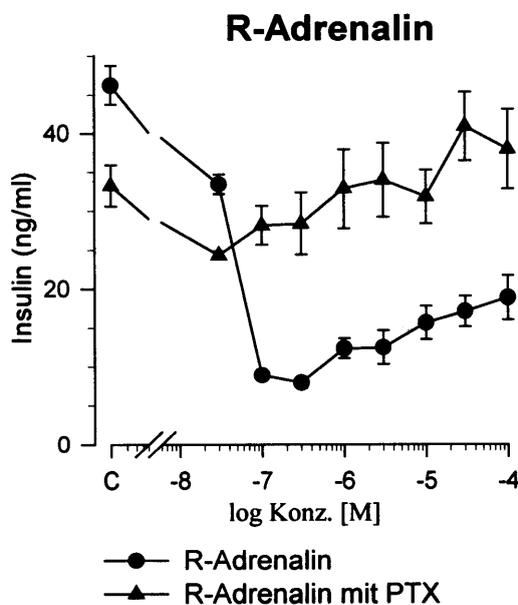


Abb.3-17: Im Kontrollversuch wurde R-Adrenalin in MIN 6 Zellen allein appliziert. Daneben wurden die Zellen 18 h mit Pertussis Toxin (=PTX) präinkubiert und anschließend nach 1 h Hungern wie im Kontrollversuch mit R-Adrenalin bei 25 mM Glukose inkubiert. Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

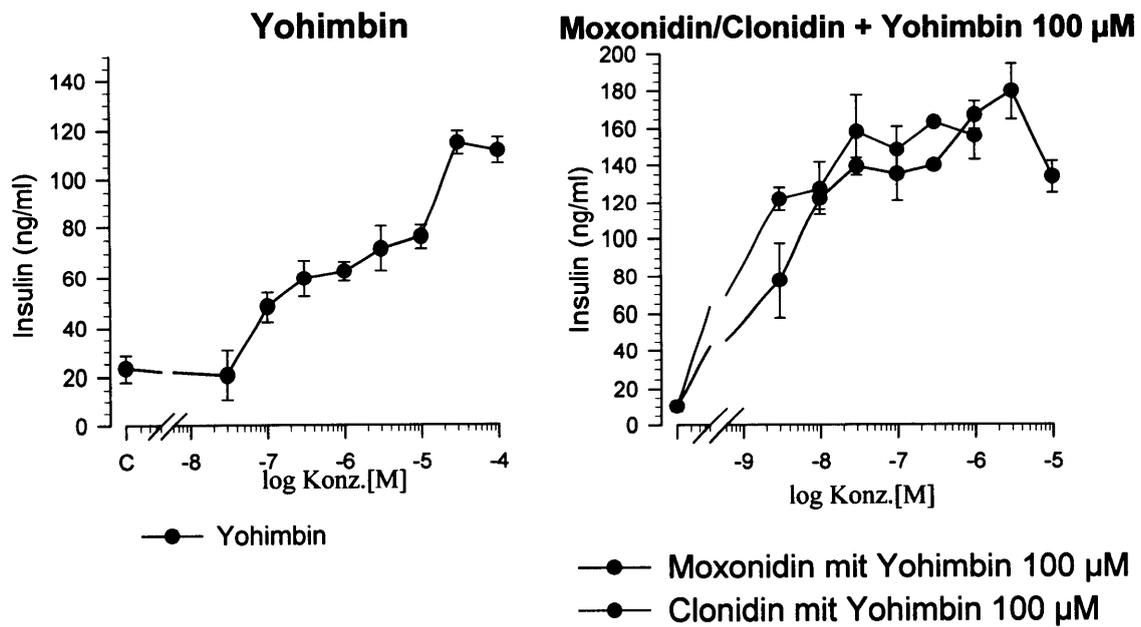


Abb.3-18: MIN 6 Zellen wurden 1 h gehungert und anschließend 1 h bei 25 mM Glukose mit Yohimbin oder den o.g. alpha-2 Agonisten sowie mit 100 µM Yohimbin (alpha-Blocker) inkubiert. Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Konzentrations-Wirkungskurven je eines von 3 unabhängigen Insulinfreisetzungsexperimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

3.1.11. Insulinfreisetzungsversuche mit INS 1 Zellen

INS 1 Zellen erwiesen sich bei den Insulinfreisetzungsversuchen im Vergleich zu MIN 6 Zellen als deutlich weniger geeignet, da Imidazolin-, Sulphonylharnstoff- und auch Glukoseapplikationen in INS 1 Zellen zu einer deutlich geringeren absolut freisetzbaren Insulinmenge bei gleicher Zellzahl als in MIN 6 Zellen führte. Zum Teil war außerdem ein geringerer prozentualer Anstieg in den Konzentrations-Wirkungskurven zu sehen. INS 1 Zellen waren hinsichtlich der Zellkultur nicht so einfach zu handhaben wie MIN 6 Zellen. So mußten beispielsweise für den Insulinfreisetzungsversuch mit statischer Inkubation die Mikrotiterplatten mit Poly-D Lysin beschichtet werden, um ein Ablösen der Zellen zu verhindern. Die verwendeten INS 1 Zellsukklone sowie die jeweiligen Zellpassagen zeigten auch im Vergleich untereinander ein sehr inhomogenes Insulinfreisetzungsverhalten. Beispielsweise zeigten INS 1 Zellen von einem Sukklon und einer bestimmten Passage selbst auf depolarisierende KCl Konzentrationen von 25 mM keine Insulinfreisetzung, obwohl die Zellen in einem Trypanblautest nicht angefärbt wurden und demnach nicht

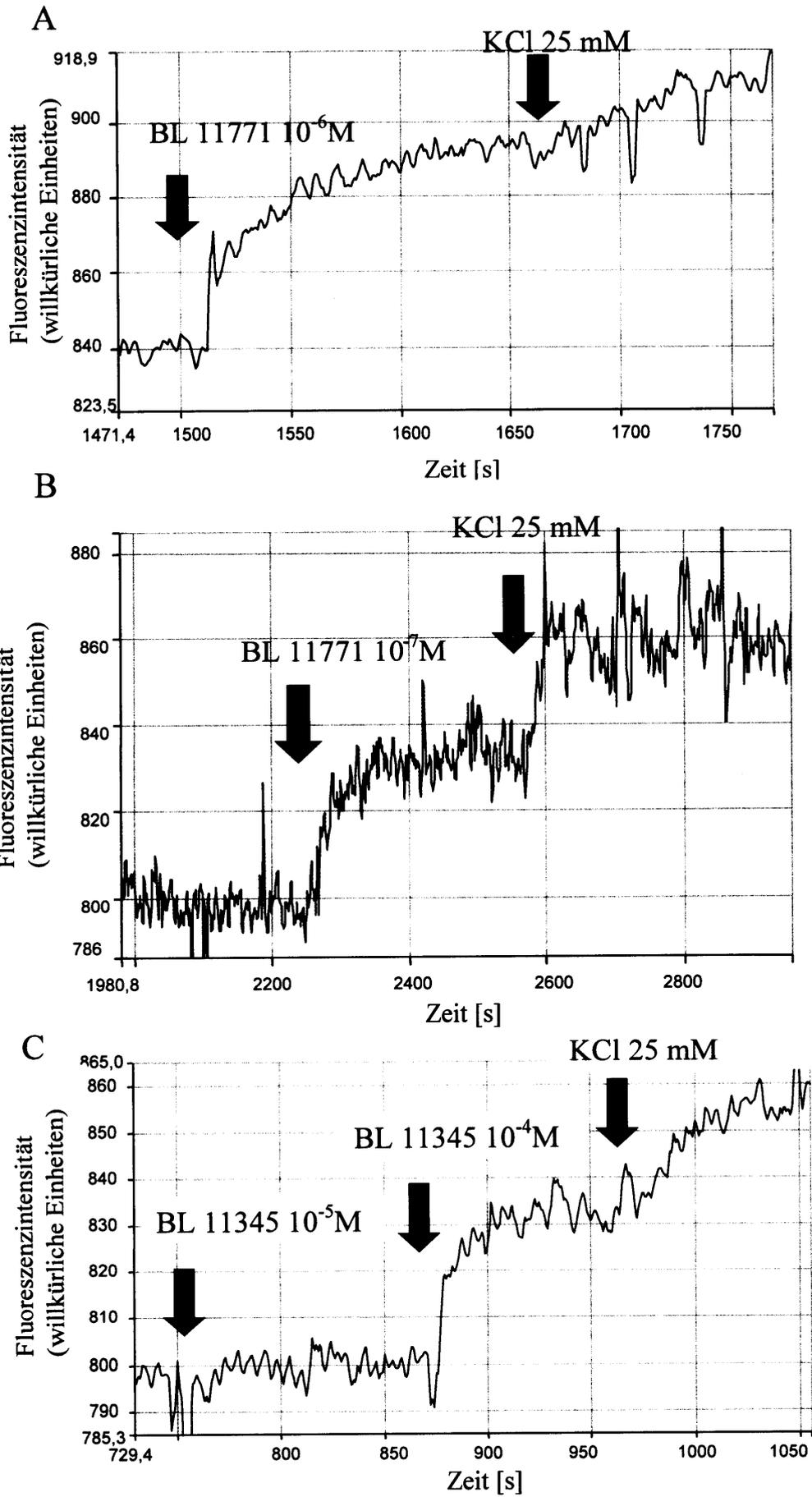
abgestorben waren. Die o.g. Nachteile der INS 1 Zelllinie waren in MIN 6 Zellen nicht zu beobachten. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden nur noch MIN 6 Zellen benutzt. Die Handhabung in der Zellkultur, gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse u.a. Vorteile gegenüber INS 1 Zellen waren ausschlaggebend für den Verzicht auf INS 1 Zellversuche.

3.2. Depolarisationsversuche mit der Bisoxonol-Methode

3.2.1. Untersuchung der depolarisierenden Aktivität von Naphthol- und Indolimidazolinen in MIN 6 Zellen

Das Naphtholimidazolin BL 11771 wurde auf depolarisierende Wirkung untersucht. Die Substanzapplikation führte zu einer konzentrationsabhängigen Depolarisation in MIN 6 Zellen (Abb.3-19). Ein ähnlicher Effekt in bezug auf Depolarisation wurde auch bei dem Naphtholimidazolin BL 11778 beobachtet (Graphen nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu führte die Applikation der beiden Indolderivate BL 11345 und BL 11282 in einer Konzentration von 10 μM nicht zu einer Depolarisation, obwohl diese Konzentration zu einer signifikanten Steigerung der Insulinfreisetzung in MIN 6 Zellen führte (siehe Kap.3.1.). Bei einer Konzentration von 100 μM wurde auch bei diesen Verbindungen eine Depolarisation beobachtet, wobei es bei dieser Konzentration bereits wieder zu einer Abnahme der Insulinfreisetzung kam. Der Fluoreszenzzuwachs nach 25 mM KCl Applikation deutet auf eine Depolarisation hin und aufgrund der nicht vorhandenen Eigenfluoreszenz sowie der gut reproduzierbaren depolarisierenden Wirkung diente KCl als Kontrolle. Die Naphtholimidazoline BL 11771 und BL 11778 störten die Messung nicht da sie nur im UV-Bereich angeregt werden können und die Indolimidazoline BL 11282 und BL 11345 fluoreszieren grundsätzlich nicht. Unterschiede in der Fluoreszenz nach Gleichgewichtseinstellung zu Beginn der Experimente sind auf unterschiedliche Schlitzbreiten der Monochromatoren zurückzuführen. Die Graphen in Abb.3-19 repräsentieren eines von mindestens 6 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen. Eine weitergehende Untersuchung der depolarisierenden Wirkung der Naphtholimidazolinverbindung BL 11771 führte zur in Abb.3-20 dargestellten Konzentrations-Depolarisations-Kurve. Die Berechnete EC_{50} der Depolarisation lag bei $3,17 \times 10^{-6}$ M, was eine ungefähr um den Faktor 10 erhöhte Konzentration im Vergleich zur EC_{50} der Insulinfreisetzung darstellt (siehe Kap.3.1.). Der Graph repräsentiert eines von drei unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen. Ähnliche Resultate wurden mit BL 11778 erhalten (Graph nicht gezeigt).



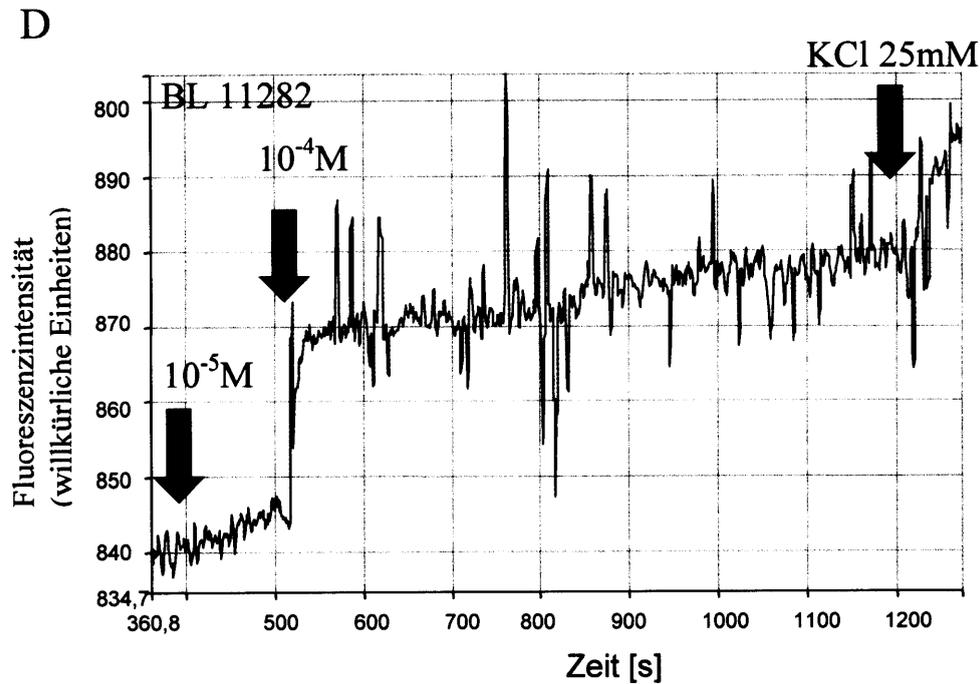


Abb.3-19: Bisoxonol-Membranpotentialmessung. Die Y-Achse repräsentiert die Fluoreszenzintensität. Die X-Achse repräsentiert die Zeit in Sekunden. Die Verbindungen wurden in den angegebenen Endkonzentrationen zu den MIN 6 Zellen in die Küvette pipettiert. 25 mM KCl diente als fluoreszenzunabhängige Kontrolle der Zellintegrität. Die Glukosekonzentration betrug 25 mM. Der Zeitpunkt der Substanzzugabe ist durch Pfeile markiert. Die konzentrationsabhängige Depolarisation des Naphtholimidazolins BL 11771 in einer Konzentration von $10^{-6} M$ in (A) und $10^{-7} M$ in (B). Die Indolimidazoline BL 11345 (C) und BL 11282 (D) haben MIN 6 Zellen in einer Konzentration von $10 \mu M$ nicht depolarisiert, obwohl bei dieser Konzentration eine starke Insulinfreisetzung erfolgte. Unterschiede in der Fluoreszenzgleichgewichtseinstellung sind auf unterschiedliche Schlitzweiten der Monochromatoren zurückzuführen. Die Graphen repräsentieren eines von mindestens 6 unabhängigen Experimenten.

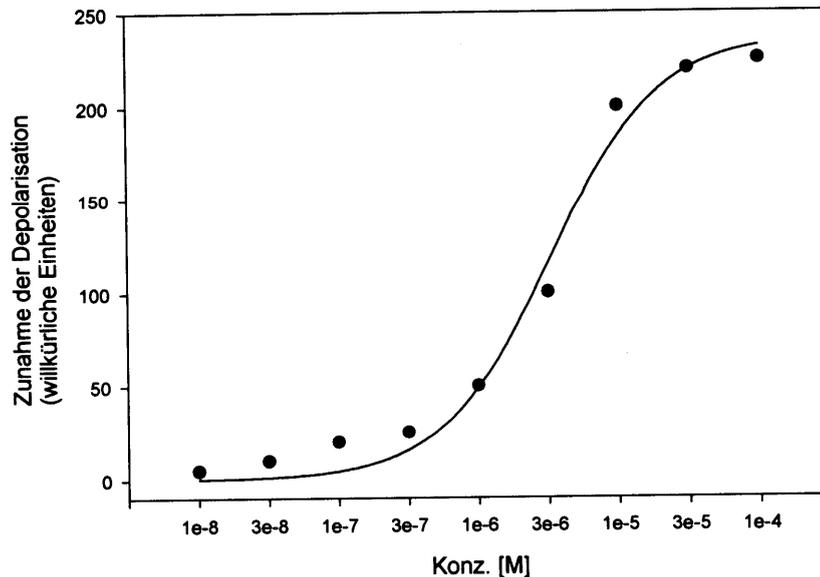


Abb.3-20: Konzentrationsabhängige Depolarisation von MIN 6 Zellen mit dem Naphthol-Imidazolin BL 11771. Die Y-Achse repräsentiert Fluoreszenzintensität und somit den Grad der Depolarisation. Die X-Achse zeigt die Konzentration von BL 11771 in der Küvette an. Es wurden steigende Mengen des Imidazolins zu den gleichen Zellen in der Küvette pipettiert, was zu der jeweils angegebenen Endkonzentration führte. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen der EC_{50} der Depolarisation ($3,17 \times 10^{-6} M$) und der EC_{50} der Insulinfreisetzung ($3,40 \times 10^{-7} M$) für BL 11771. Die Graphik repräsentiert eines von 6 unabhängigen Experimenten.

3.2.2. Untersuchung der depolarisierenden Aktivität von Sulphonylharnstoffen in MIN 6 Zellen

Die Untersuchung der Sulphonylharnstoffe Tolbutamid und Glibenclamid zeigte wie bei den Naphtholimidazolinen BL 11771 und BL 11778 eine konzentrationsabhängige Depolarisation von MIN 6 Zellen, wobei die Sulphonylharnstoffe im Vergleich zu den Imidazolinen erst bei höheren Konzentrationen zu einer Zelldepolarisation führten. In Abb.3-21 ist die Depolarisation von Tolbutamid bei einer Konzentration von $10 \mu M$ in MIN 6 Zellen sowie eine Konzentrations- Depolarisationskurve für Tolbutamid dargestellt. Die berechnete EC_{50} der Depolarisation von Tolbutamid lag bei $1,18 \times 10^{-5} M$ und lag somit um $\sim 10x$ höher als die EC_{50} der Depolarisation von BL 11771 ($3,17 \times 10^{-6} M$).

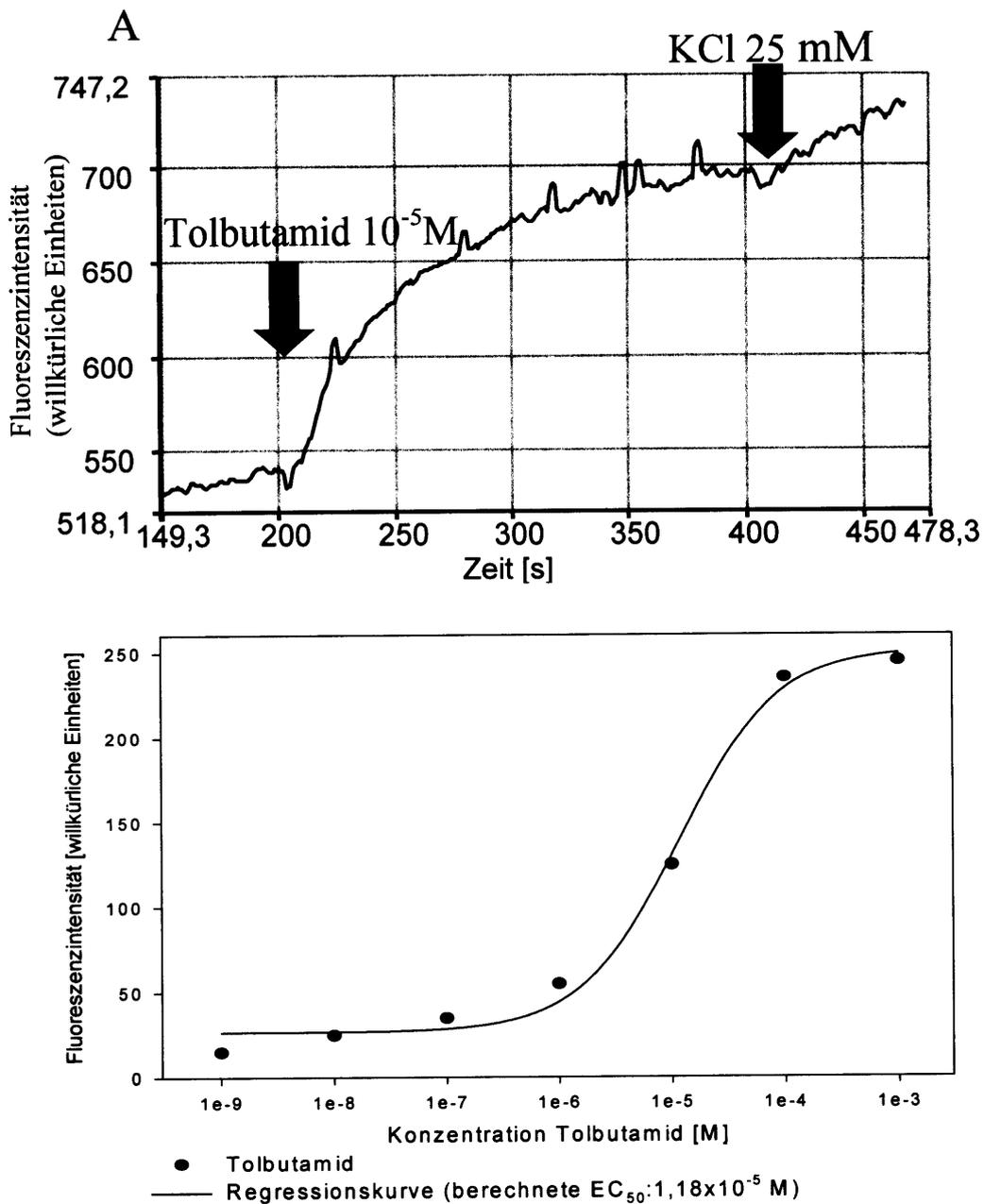
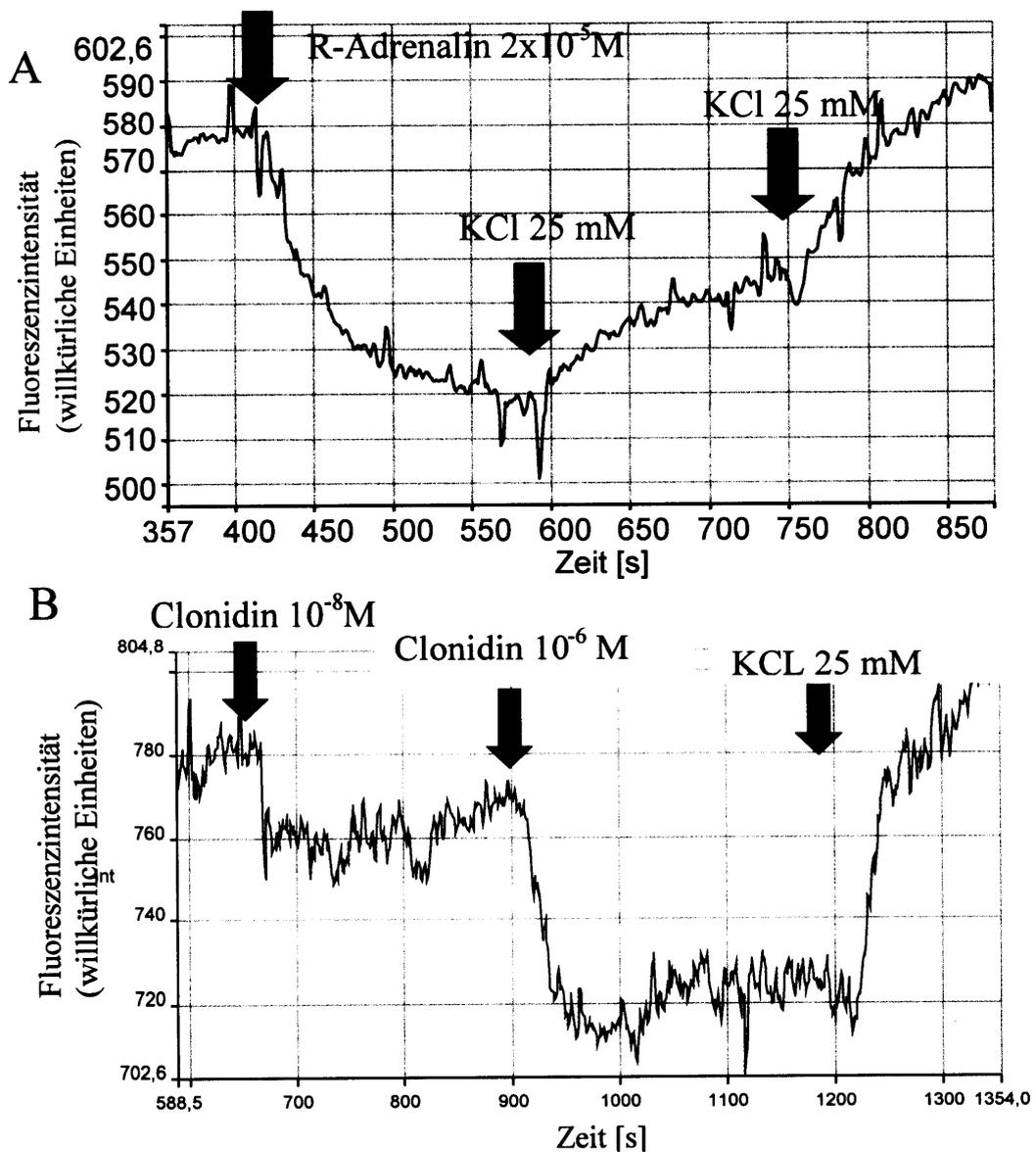


Abb.3-21: Bisoxonol-Membranpotentialmessung. Die konzentrationsabhängige Depolarisation des Sulphonylharnstoffes Tolbutamid in einer Konzentration von 10^{-5} M in (A). Die Y-Achse repräsentiert die Fluoreszenzintensität. Die X-Achse repräsentiert die Zeit in Sekunden. Die Verbindung wurden in den angegebenen Endkonzentrationen zu den MIN 6 Zellen in die Küvette pipettiert. 25 mM KCl diente als fluoreszenzunabhängige Kontrolle der Zellintegrität. Die Glukosekonzentration betrug 25 mM. Der Zeitpunkt der Substanzzugabe ist durch Pfeile markiert. Konzentrationsabhängige Depolarisation von MIN 6 Zellen mit dem Sulphonylharnstoff Tolbutamid in (B). Experiment und Legende wie in Abb. 2.2. Die Graphik repräsentiert eines von 6 unabhängigen Experimenten.

3.2.3. Einflüsse von unselektiven alpha- und selektiven alpha-2 Agonisten auf das MIN 6 Zellpotential

Die Applikationen des unselektiven alpha-Agonisten Oxymetazolin sowie der selektiven alpha-2 Agonisten R-Adrenalin, Moxonidin und Clonidin führten alle zu einer Hyperpolarisation von MIN 6 Zellen. Dies steht in Übereinstimmung mit den entsprechenden Insulinfreisetzungsversuchen, bei denen die Substanzen alle zu einer Reduktion der Insulinfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle führten. Das Ausmaß der Hyperpolarisation war bei allen verwendeten Substanzen konzentrationsabhängig, wohingegen die entsprechende Verminderung der Insulinfreisetzung keine konzentrationsabhängige Charakteristik zeigte.



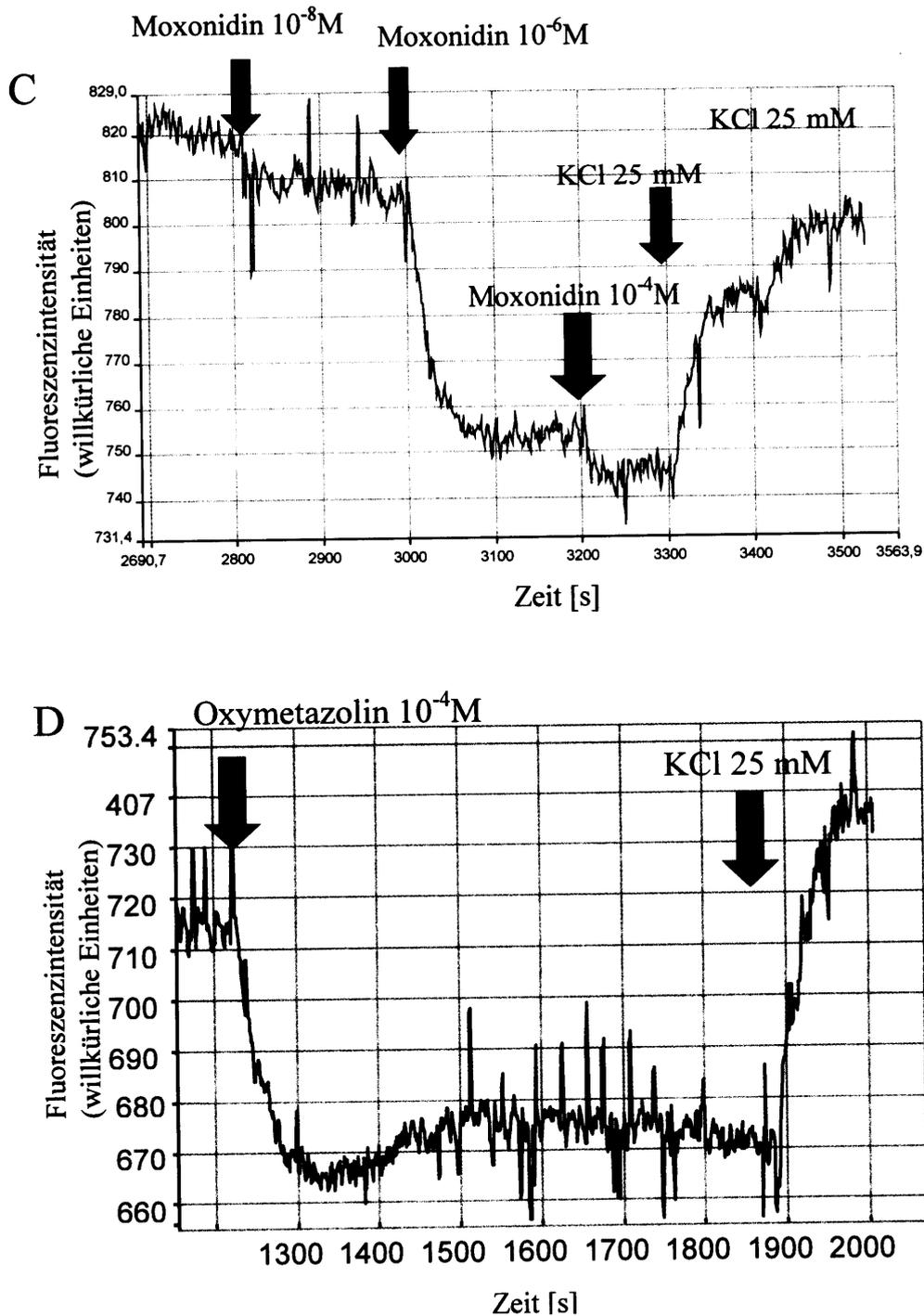
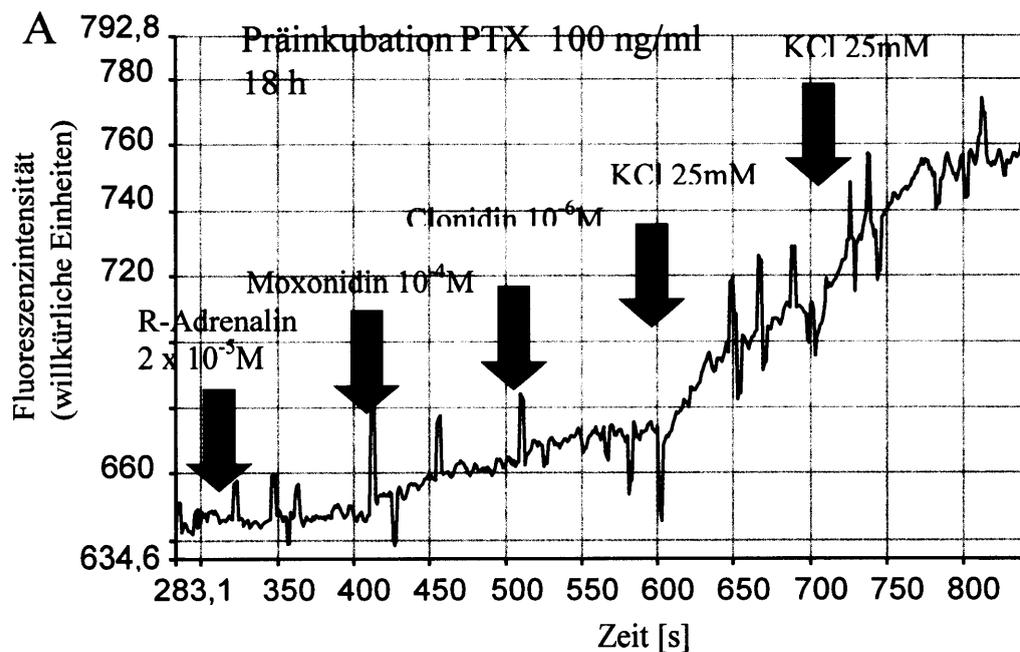


Abb.3-22: Bisoxonol-Membranpotentialmessung. Die Y-Achse repräsentiert die Fluoreszenzintensität. Die X-Achse repräsentiert die Zeit in Sekunden. In (A) wurde R-Adrenalin, in (B) Clonidin, in (C) Moxonidin und in (D) Oxymetazolin zu nicht PTX vorbehandelten MIN 6 Zellen pipettiert. 25 mM KCl diente als fluoreszenzunabhängige Kontrolle der Zellintegrität. Die Glukose-konzentration betrug 25 mM. Die Zeitpunkte der Substanzzugaben sind durch Pfeile markiert. Die Graphen repräsentieren eines von mindestens 6 unabhängigen Experimenten.

3.2.4. Einflüsse von unselektiven alpha- und selektiven alpha-2 Agonisten auf das MIN 6 Zellpotential nach PertussisToxin Präinkubation

Präinkubation von MIN 6 Zellen mit Pertussis Toxin führte zu einer Ausschaltung der Funktion von alpha-2 Rezeptoren. Die im vorigen Abschnitt 3.2.3. besprochenen Substanzen entfalten ihre in bezug auf Insulinfreisetzung hemmende Wirkung über diese Rezeptoren. In Abb.3-23 ist der Einfluß von R-Adrenalin, Moxonidin und Clonidin in mit PTX vorbehandelten Zellen bezüglich des Zellpotentials dargestellt. Dabei zeigt sich, daß die Applikation von R-Adrenalin in MIN 6 Zellen keine Änderung des Membranpotentials bewirkte. Auf der anderen Seite kam es jedoch durch Moxonidin und Clonidin zu einer Depolarisation der MIN 6 Zellen. Diese elektrophysiologischen Ergebnisse decken sich auch mit den Insulinfreisetzungsversuchen, bei denen Moxonidin und Clonidin nach PTX Vorbehandlung der Zellen ebenfalls eine Steigerung der Insulinfreisetzung bewirkten im Gegensatz zu ihrer hemmenden Wirkung in unbehandelten Zellen.



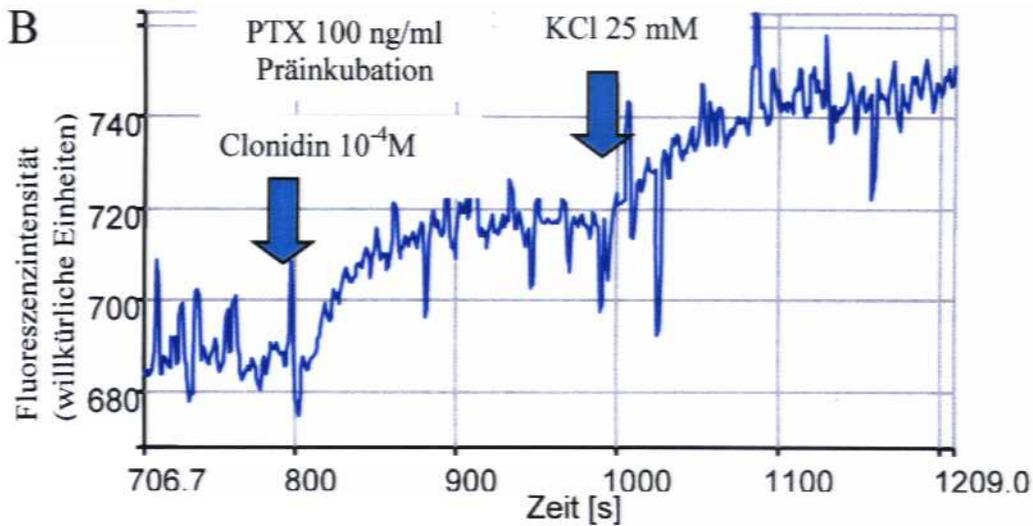
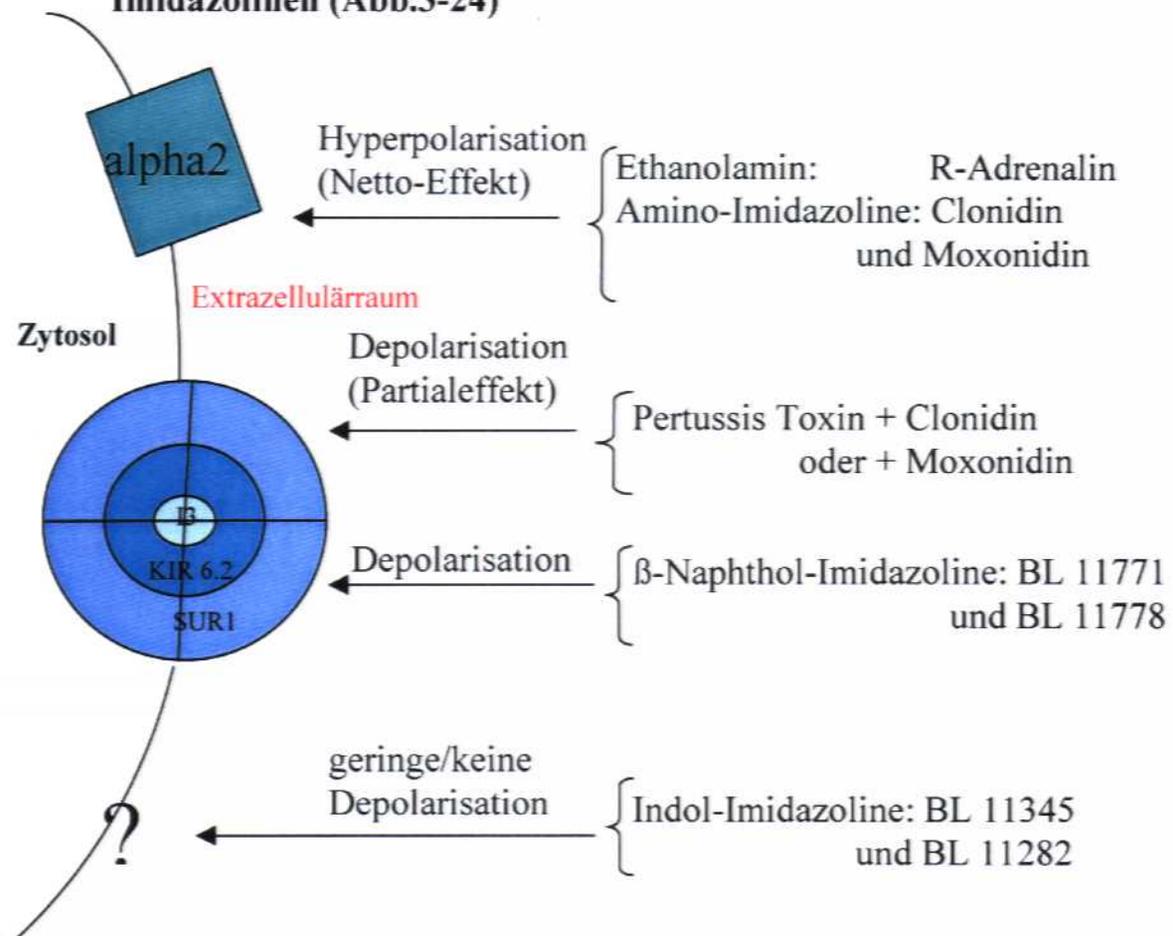


Abb.3-23: MIN 6 Zellen wurden 18 Stunden mit Pertussis Toxin (=PTX) in normalem DMEM Wachstumsmedium präinkubiert und im anschließend durchgeführten Bisoxonolversuch wurden die jeweiligen Substanzen zu den Zellen in den angegebenen Endkonzentrationen pipettiert. In (A) ist die nacheinander folgende Applikation von R-Adrenalin, Moxonidin und Clonidin dargestellt. In (B) wurde Clonidin alleine appliziert. Die Graphen repräsentieren jeweils eines von mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

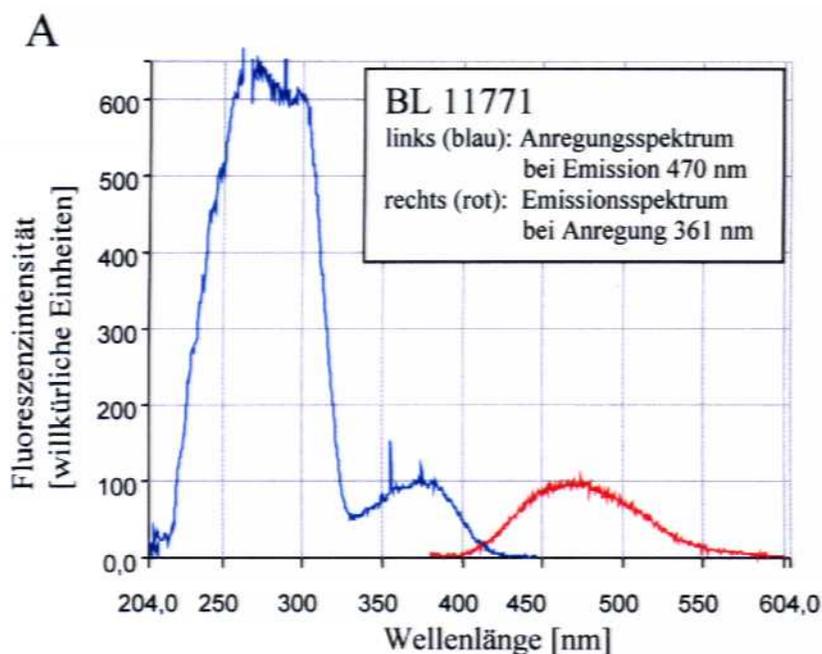
3.2.5. Übersicht über elektrophysiologische Wirkungen von Imidazolininen (Abb.3-24)



3.3. Fluoreszenzmessungen in MIN 6 Zellen

3.3.1. Fluoreszenzspektren der Naphtholimidazoline

Die beiden Naphtholimidazolinverbindungen BL 11771 und BL 11778 erwiesen sich im Verlauf der Arbeit als fluoreszenzaktiv. Daraufhin wurden Fluoreszenzspektren der beiden Verbindungen aufgenommen. Beide Substanzen werden ausschließlich im UV-Bereich angeregt mit Anregungsmaxima von 260 und 380 nm bei BL 11771 und 250, 300 und 345 nm bei BL 11778. Die Emissionsmaxima lagen bei 470 nm (BL 11771) und bei 440 nm (BL 11778). Da die Fluoreszenzaktivität für die Confokale Laserscanning Mikroskopie (=CLSM) genutzt werden sollte, wurden auch Spektren der Substanzen nach Inkubation mit MIN 6 Zellen gemacht. Die im Handel befindlichen CLSM- Mikroskope haben nur UV-Laser mit 351 und 364 nm Anregungswellenlänge. Deshalb wurden die Spektren mit einer Anregungswellenlänge von 364 nm erstellt. Hier zeigten sich im Vergleich zu den Spektren der Substanzen ohne MIN 6 Zellen nur geringe Unterschiede bezüglich der Größenverhältnisse der Maxima untereinander. Es waren aber keine Rot- oder Blauverschiebungen zu beobachten. Die unten abgebildeten Spektren wurden mit einer MIN 6-Zellsuspension erstellt.



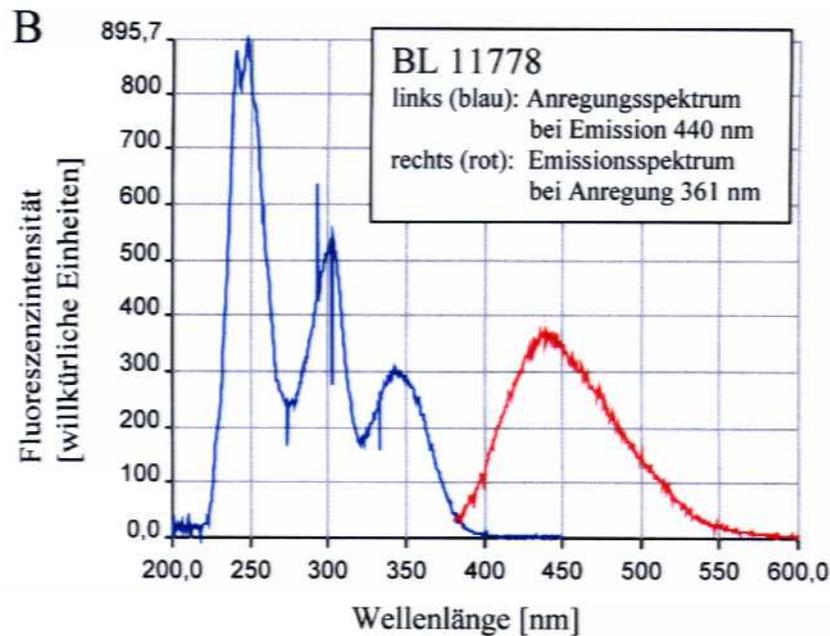


Abb.3-25: MIN 6 Zellen wurden in modifiziertem Krebs Ringer Puffer (=KRBH) in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml suspendiert und mit den Imidazolin BL 11771 (A) bzw. mit BL 11778 (B) bei Raumtemperatur 10 Minuten bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ inkubiert. Nach Zentrifugation und Resuspension in KRBH ohne die Wirkstoffe wurden die Anregungs- und Emissionsspektren aufgenommen.

3.3.2. Confokale Laserscanning Mikroskopie (=CLSM) von MIN 6 Zellen mit den Imidazolin BL 11771 und BL 11778

Um Aufschlüsse über zytosolische Bindungsorte von den Imidazolin zu bekommen wurden Untersuchungen von MIN 6 Zellen mit einem Confokalen Laserscanning Mikroskop durchgeführt. Zunächst wurden MIN 6 Zellen mit BL 11771 bzw. BL 11778 jeweils alleine inkubiert und anschließend eine CLSM durchgeführt. Dabei zeigte sich sowohl bei BL 11771 als auch bei BL 11778 ein punktuell Färbemuster im Bereich des Zytoplasmas von MIN 6 Zellen.

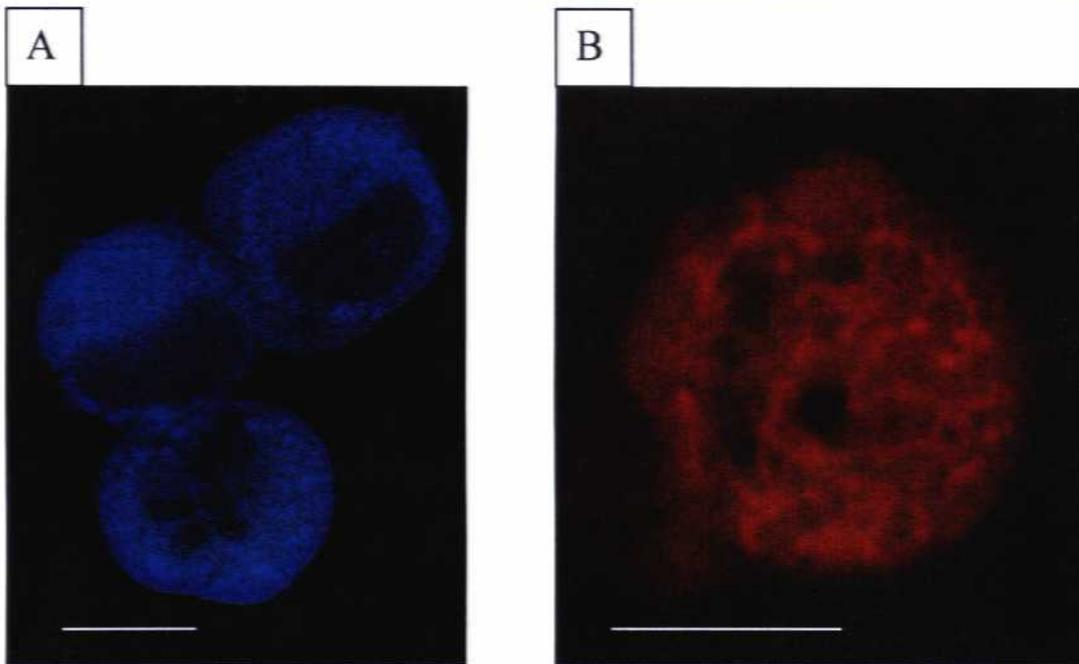


Abb.3-26: Intakte MIN 6 Zellen wurden in KRBH suspendiert und mit BL 11771 (A) bzw. BL 11778 (B) inkubiert. Anschließend erfolgte Confokale Laserscanning Mikroskopie (CLSM) bei einer UV-Laseranregungswellenlänge von jeweils 361 nm und einem Emissionsfenster von 450 bis 490 nm (A) und 435 bis 480 nm (B). Die Farbe in Bild (B) wurde mit der Leica Software von blau auf rot geändert um die Konturen besser sichtbar zu machen. Die Balken repräsentieren jeweils 10 μm .

3.3.3. CLSM von MIN 6 Zellen mit Imidazolinen und Newport Green

Eine grobe Analyse der Größenverhältnisse ergab Durchmesser der angefärbten runden Strukturen von ca. 200 bis 500 nm. Verschiedene Zellorganellen wie z.B. Lysosomen, Mitochondrien, oder Peroxisomen haben Durchmesser in diesem Größenbereich und waren mögliche Bindungsorte. Im Fall von insulinhaltigen MIN 6 Zellen kamen allerdings auch Insulingranula in Frage. Um die Identität der Strukturen herauszufinden wurden mehrere Farbstoffe die Zellorganellen anfärben getestet. Mit dem Zinkindikator Newport Green (=NPG) wurde schließlich ein Farbstoff gefunden, dessen Färbemuster mit dem der Imidazoline BL 11771 und BL 11778 übereinstimmte. NPG detektiert ungebundenes Zink, das in Insulinspeichergranula vorhanden ist. NPG wurde mit MIN 6 Zellen in seiner membranpermeablen Diacetatstruktur 1 Stunde inkubiert und nach Membrandurchtritt von intrazellulären Esterasen in seine membranimpermeable Form hydrolysiert, wodurch NPG sich in den Zellen anreicherte. Zn^{2+} Ionen formen in Insulingranula mit Insulin Komplexe im

Verhältnis 2 Zn^{2+} : 6 Insulin. Unkomplexiertes, überschüssiges Zink in Insulingranula wurde von NPG gebunden und führte zu einer verstärkten Fluoreszenz des Farbstoffes. Durch die unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen von NPG und den Imidazolen konnten beide Substanzen zeitgleich in den selben Zellen, ohne gegenseitige Störung detektiert und ihre Überlagerung gezeigt werden. Auffallend waren die Unterschiede in der Dichteverteilung von Granula innerhalb der einzelnen Zellen. Die in der ersten Reihe gezeigten Zellschnitte zeigen nahezu keine granuläre Verteilung, die Zellschnitte der mittlere Reihe zeigen bereits einige Granula und in den Zellschnitten der untersten Reihe sind schließlich sehr dichte Granulaverteilungen zu sehen.

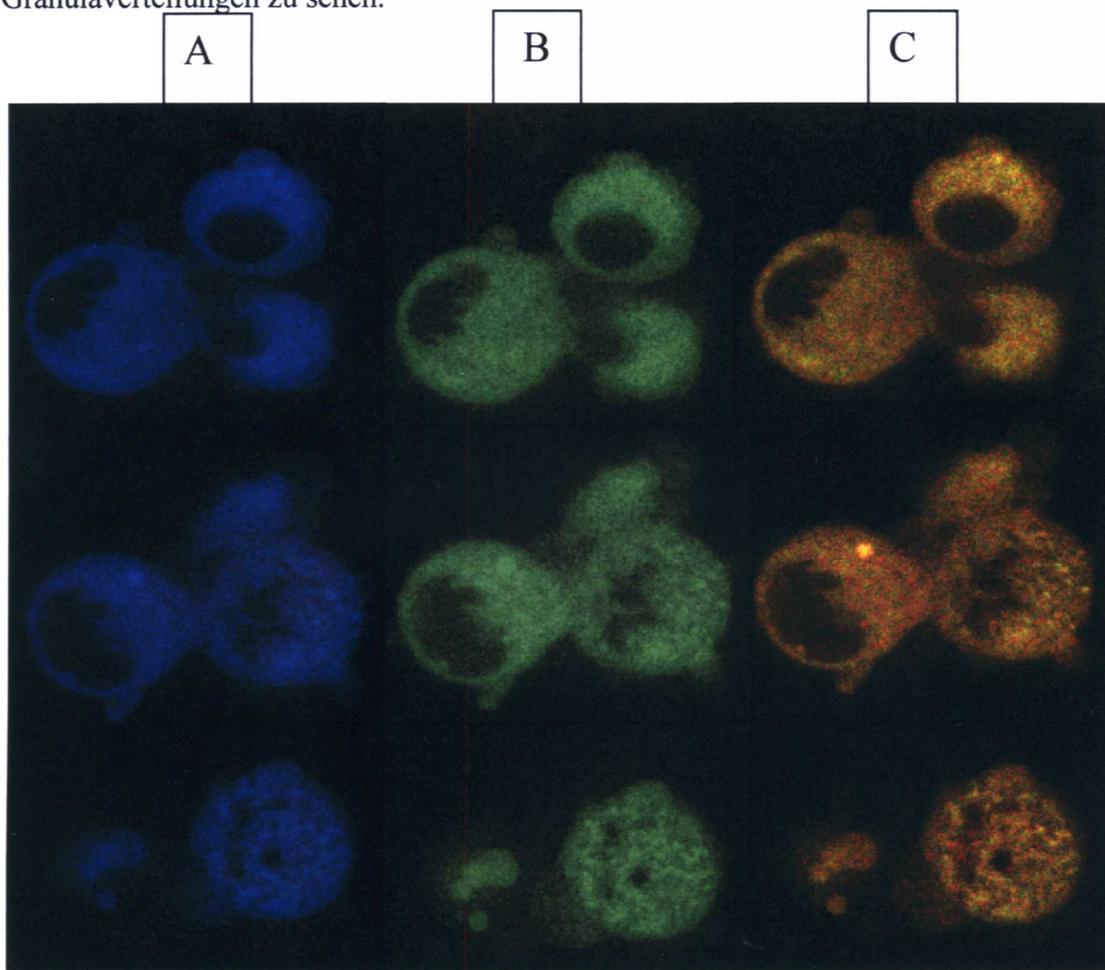


Abb.3-27: Suspendierte, intakte MIN 6 Zellen wurden mit BL 11778 $1\mu M$ sowie dem Zinkindikator Newport Green (=NPG) $5\mu M$ inkubiert. Mit der CLSM wurden mehrere optische Zellschnitte mit jeweils 200 nm Schichtdicke gemacht. Spalte A zeigt optische MIN 6 Zellschnitte bei denen das Imidazolin BL 11778 angeregt wurde. Spalte B zeigt die gleichen Zellen wie in A, jedoch mit der Anregungs- und Emissionswellenlänge von NPG. In Spalte C werden die jeweiligen Überlagerungen von den Spalten A und B gezeigt.

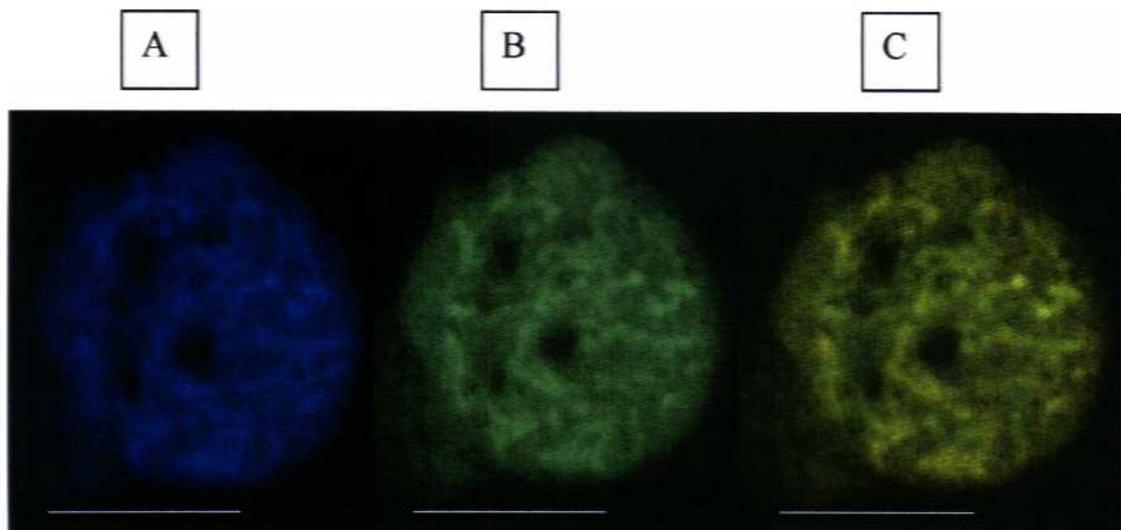


Abb.3-28: Der unterste optische Schnitt aus Abb.3-27 in vergrößerter Form. Der optische Schnitt in C (=Überlappung von A und B) wurde farblich durch die Leica Software zur Verbesserung der Auflösung nochmals verändert. Die Balken repräsentieren jeweils 10 μm .

3.3.4. CLSM von Insulin-Immunfluoreszenz und Imidazolinen

Um den Befund der Colokalisation der Imidazoline BL 11771 und BL 11778 mit den Insulingranula abzusichern wurde eine weitere CLSM durchgeführt. Die Insulingranula wurden in diesem Fall durch einen CY3-fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert. Dieser Sekundärantikörper hatte an den zunächst applizierten primären Insulinantikörper gebunden und konnte aufgrund seiner zu den Imidazolinen verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen parallel mit den Imidazolinen in den selben Zellen mikroskopisch detektiert werden. Für das Experiment wurden wie bei der NPG-Anfärbung suspendierte MIN 6 Zellen genommen. Allerdings mußten die Zellen im Gegensatz zu den anderen Mikroskopen für die Permeabilität der Antikörper mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton-X-100 permeabilisiert werden. BL 11778 wurde in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt. Ähnliche Bilder wie in Abb.3-29 wurden auch mit BL 11771 erhalten (Bilder nicht gezeigt).

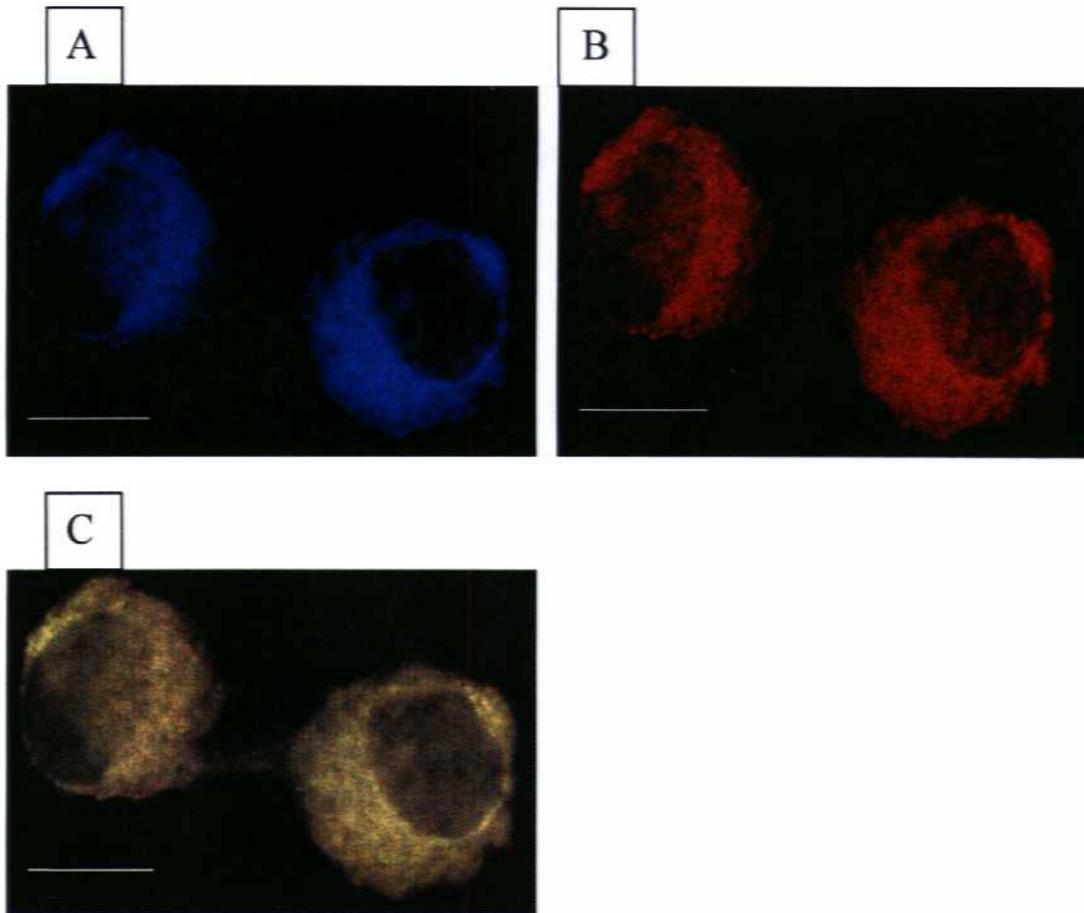


Abb.3-29: Suspensierte MIN 6 Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd-Puffer fixiert und anschließend mit 0,01% Triton X 100 in PBS permeabilisiert. CLSM-Aufnahmen der Zellen mit der Anregungswellenlänge 361 nm sowie Emissionsfenster 435-480 nm für BL 11778 in A. Die gleichen Zellen wurden für den Sekundärantikörper CY3 in B bei 514 und 543 nm angeregt, das Emissionsfenster lag zwischen 560 und 650 nm. In C ist die Überlappung von A und B dargestellt. Die Balken repräsentieren jeweils 10 μm .

3.3.5. CLSM von MIN 6 Zellen und fluoreszenzmarkiertem

Glibenclamid

Im Zusammenhang mit dem granulären Angriffsort der Imidazoline führte die Publikation von Barg et al. 1999 auf den ebenfalls granulären Angriffsort des Sulphonylharnstoffs Tolbutamid. Glibenclamid-FL sowie Glibenclamid-TR sind die einzigen kommerziell erhältlichen fluoreszenzmarkierten Sulphonylharnstoffe und wurden deshalb bei folgender Untersuchung eingesetzt: suspensierte, lebende MIN 6 Zellen wurden mit den fluoreszenzmarkierten Glibenclamidverbindungen inkubiert und die subzelluläre Verteilung der Substanzen durch CLSM untersucht. Dabei zeigte

sich ebenfalls ein punktuelles Verteilungsmuster, was die Publikation von Barg et al., 2000 bestätigt. In der Abbildung ist es gelungen, einen sehr großen Zellverband zu zeigen. Interessanterweise sind je nach Zellschicht sehr unterschiedliche Verteilungsdichten der Insulingranula zu erkennen. So sind in Abb.3-30 A viele Zellschichten sehr arm oder sogar vollkommen frei von Granula, in den Abb.3-30 B und C, die einen anderen Zellschnitt als A, aber den gleichen Zellverband zeigen sind die meisten Zellschichten hingegen sehr dicht von Granula durchsetzt. Bei den Zellschnitten in Abb.3-27 konnten ähnliche Verteilungsunterschiede innerhalb einzelner Zellen beobachtet werden.

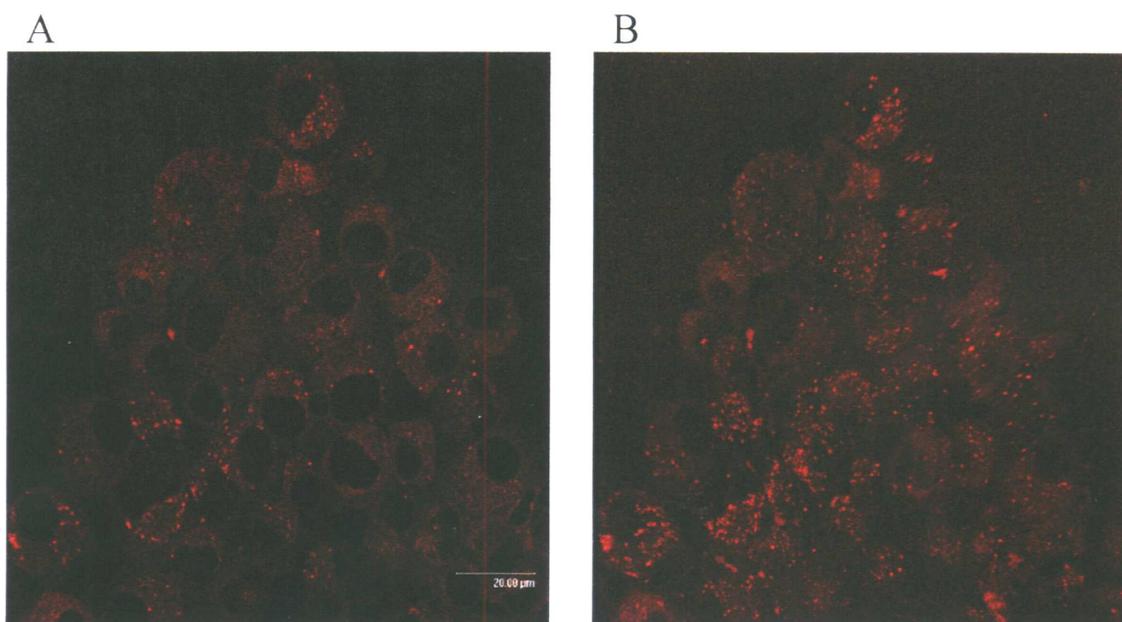
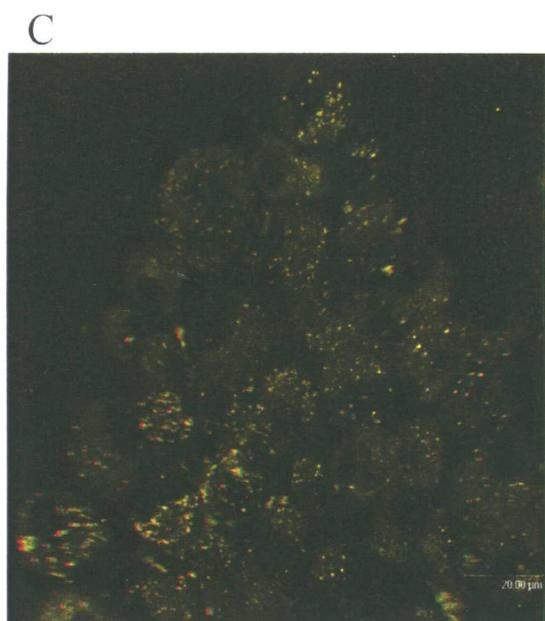


Abb.3-30: MIN 6 Zellen wurden mit den fluoreszenzmarkierten Glibenclamidverbindungen Glibenclamid-TR (A+B) und Glibenclamid-FL (C) jeweils in einer Endkonzentration von 80 nM 1 h bei 4° C in Suspension inkubiert. Nach Zentrifugation und Resuspension in KRBH erfolgte Confokale Laserscanning Mikroskopie (=CLSM). In (A) und (B) zwei Aufnahmen in unterschiedlichen Zellschichten mit Glibenclamid-TR; Exzitation 488 nm und Emission zwischen 520 und 558 nm. In (C) wurde der gleiche Zellverband in der gleichen Schicht wie in (B) aufgenommen, wobei das in den gleichen Zellen von (A) und (B) ebenfalls applizierte Glibenclamid-FL bei 543 nm angeregt wurde und dessen Emissionsfenster auf 600 bis 650 nm eingestellt wurde.



3.3.6. Fluoreszenzkinetik von BL 11778 in Abhängigkeit der Glukosekonzentration

Durch die vorangegangenen Untersuchungen konnte eine Colokalisation der Imidazoline BL 11771 und BL 11778 mit Insulingranula gezeigt werden. Der genaue Bindungspartner der Imidazoline an den Granula ist jedoch nicht bekannt. Durch die Mikroskopie konnte auch nicht sicher festgestellt werden, ob sich die Imidazoline innerhalb der Granula ohne feste Bindung anreichern oder ob eine Bindung der Imidazoline mit einem Bindungspartner der Granulamembran vorliegt. Um auf eine mögliche Anreicherung der Imidazoline in den Granula ohne Bindung an die Granulamembran zu prüfen, wurde ein Imidazolinfreisetzungsexperiment mit suspendierten MIN 6 Zellen durchgeführt. Nach Glukosestimulation und folgender Exozytose von Insulin sowie dem Verschmelzen von Insulingranula mit der Plasmamembran müßte es bei einer Imidazolinanreicherung ohne Bindung an die Granulamembran neben einer Insulinexozytose zu einer Imidazolinexozytose und somit zu einer Reduktion der Imidazolinfluoreszenzintensität in MIN 6 Zellen kommen. Es konnten zwischen den ausschließlich gehungerten und den 25 mM Glukose-stimulierten Zellsuspensionen keine Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten festgestellt werden (Abb.3-31). Bei der 25 mM Glukoseinkubationsfraktion wurden demnach durch die Insulinfreisetzung keine meßbaren Mengen BL 11778 exozytiert. Die Substanz wird folglich nicht in Insulingranula ohne Bindung an die Granulamembran akkumuliert.

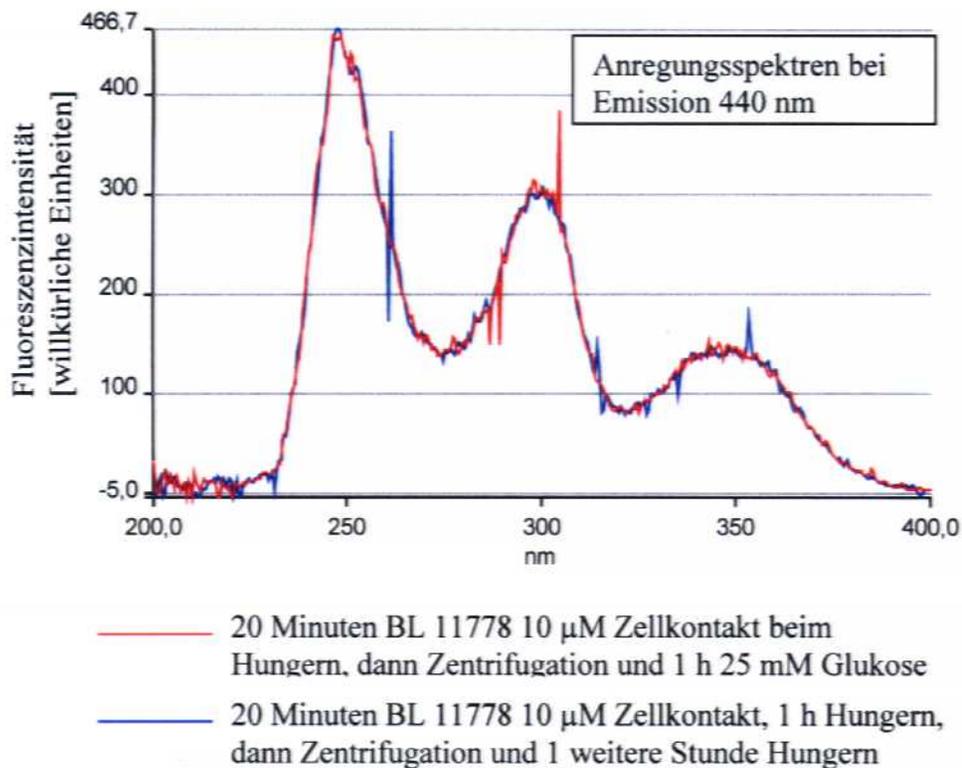


Abb.3-31: Suspendierte, intakte MIN 6 Zellen wurden 1 h gehungert. Am Ende der Hungerphase wurde 20 Minuten mit BL 11778 10 μ M inkubiert, danach zentrifugiert und eine Zellgruppe in 0 mM Glukose, die andere Zellgruppe in 25 mM Glukose ohne Imidazolin resuspendiert und eine weitere Stunde inkubiert. Nach Zentrifugation und Resuspension in imidazolinfreiem Medium wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen.

3.3.7. Fluoreszenzkinetik von BL 11778 in Abhängigkeit der Inkubationsdauer

Die Insulinfreisetzungsversuche in 3.1.9. haben gezeigt, daß die Imidazoline keineswegs eine ganze Stunde während der Glukosestimulation im Zellmedium anwesend sein müssen. Eine Präinkubation der Zellen von einer Minute mit BL 11778 während der Hungerphase genügte, um eine zur Kontrolle vergleichbare Insulinfreisetzung zu erreichen. Um inkubationszeitabhängige Unterschiede in der Bindungs- und Aufnahmekapazität von BL 11778 in MIN 6 Zellen zu untersuchen, wurde folgender Versuch durchgeführt: gleiche Mengen suspendierter, intakter MIN 6 Zellen wurden 5, 20 und 60 Minuten mit BL 11778 in Kontakt gebracht, danach jeweils zentrifugiert und in imidazolinfreiem Medium resuspendiert. Anschließend

wurden Anregungsfluoreszenzspektren der Zellsuspensionen aufgezeichnet. Danach wurde nochmals zentrifugiert und resuspendiert sowie Spektren aufgezeichnet. Zwischen den Zellgruppen mit unterschiedlicher Imidazolininkubationsdauer konnten keine deutlichen Unterschiede der Fluoreszenzintensität festgestellt werden. Nach 5 Minuten Zellkontakt von BL 11778 war also bereits die maximale Aufnahme- und Bindungskapazität der MIN 6 Zellen erreicht. Auffallend war auch, daß durch die zweiten Zentrifugation eine deutliche, bei allen drei Zellgruppen ähnlich starke Abnahme der Fluoreszenzintensitäten eintrat (Abb.3-32). Dies spricht für einen bestimmten nicht fest gebundenen Anteil BL 11778, der durch mechanische Einwirkung aus MIN 6 Zellen herausströmt.

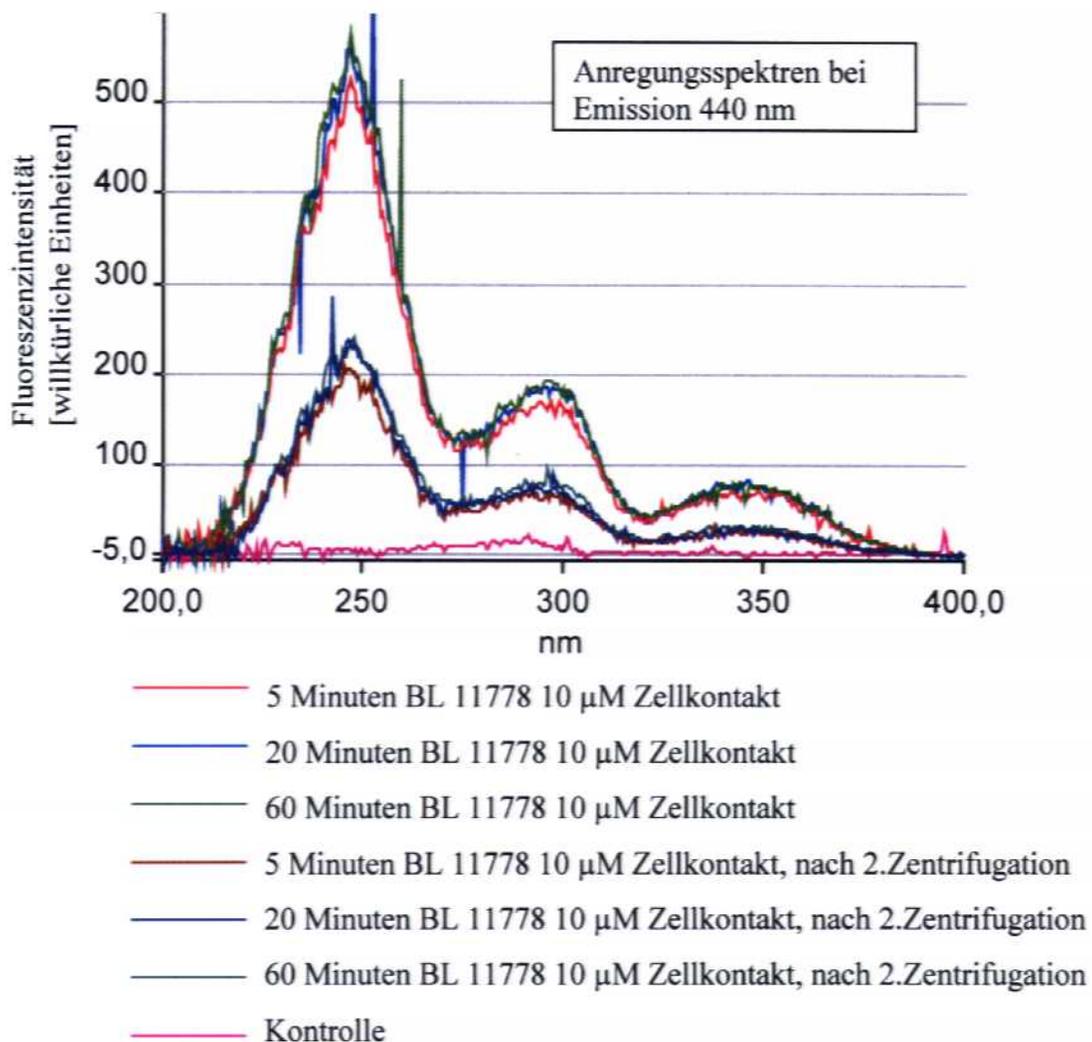


Abb.3-32: Suspensierte, intakte MIN 6 Zellen wurden unterschiedlich lange mit BL 11778 in Kontakt gebracht, danach zentrifugiert und in imidazolinfreiem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die gleichen Zellgruppen nochmals zentrifugiert und resuspendiert.

3.4. Untersuchungen zur Beeinflussung der cAMP Konzentrationen durch Naphthol- und Indolimidazoline in MIN 6 Zellen

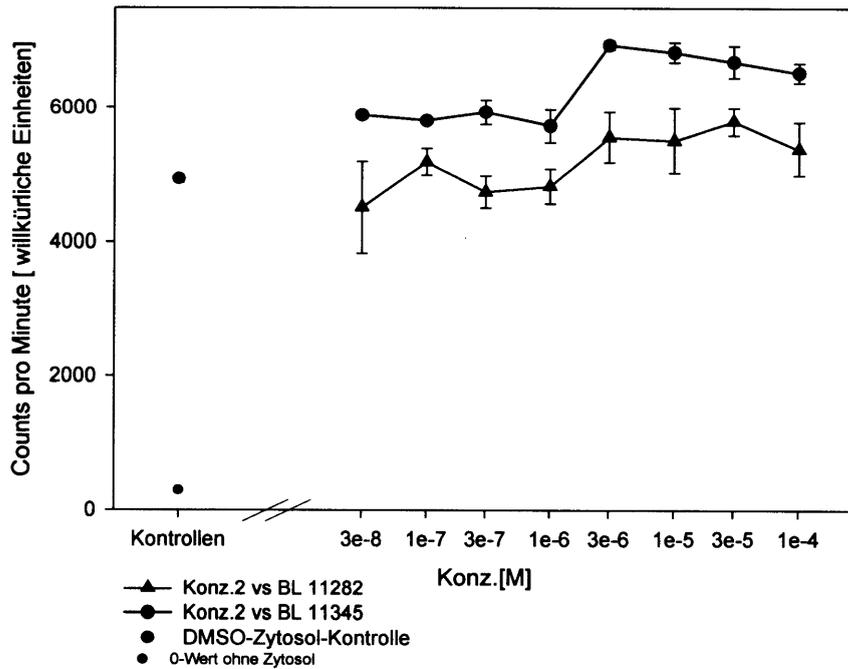
Zyklisches AMP (=cAMP) ist für die Insulinsekretion von großer Bedeutung. Der Einfluß der Naphtholimidazoline BL 11771 und BL 11778 sowie der Indolimidazoline BL 11282 und BL 11345 auf die cAMP Spiegel in MIN 6 Zellen wurde aus diesem Grund untersucht. Erhöhungen der cAMP-Konzentrationen werden hauptsächlich durch Inhibition von Phosphodiesterasen oder durch Aktivierung von Adenylatzyklen verursacht.

3.4.1. Messung der Phosphodiesteraseaktivität

Mit einem Scintillation Proximity Assay (=SPA) wurde die Veränderung der [³H] cAMP Konzentration in MIN 6 Zellhomogenat bestimmt. Das der Messung zugrundeliegende Prinzip ist die höhere Affinität von nichtzyklischem, durch Spaltung von [³H] cAMP entstandenem offenkettigem [³H] AMP zu den verwendeten Yttrium-Silikat Kügelchen im Vergleich zu [³H] cAMP. Es wurden statistisch signifikante Anstiege der Counts pro Minute von der 0-Kontrolle, die kein MIN 6 Zellhomogenat enthielt, im Vergleich zur DMSO- und MIN 6 Zellhomogenat-haltigen Kontrolle beobachtet. Die Counts stiegen von 304 +/- 24 SEM Counts/Minute auf 3612 +/- 65 SEM bzw. 4932 +/- 89 SEM. Unter den Versuchsbedingungen waren demnach aktive Phosphodiesterasen im Zellhomogenat vorhanden. Bei den Untersuchungen mit BL 11282 und BL 11345 stand das Zellhomogenat etwas länger als in dem anderen Experiment. Dadurch konnte noch mehr [³H] cAMP umgesetzt werden als in dem anderen Experiment mit BL 11771 und BL 11778. Das zeitabhängige Ausmaß der Umsetzung ist ein weiterer Hinweis auf aktive Phosphodiesterasen in dem MIN 6 Zellhomogenat der durchgeführten Experimente. In Anwesenheit der jeweils untersuchten Imidazoline konnte keine statistisch signifikante Abnahme der Counts pro Minute bzw. keine statistisch signifikante Abnahme der Spaltung von [³H] cAMP in offenkettiges [³H] AMP nachgewiesen werden. Somit konnte festgestellt werden, daß alle 4 untersuchten Imidazoline keine statistisch signifikante PDE-inhibitorische Aktivität in MIN 6 Zellhomogenat haben.

PDE-Inhibition BL 11282/BL 11345

A



B

PDE-Inhibition BL 11778/BL 11771

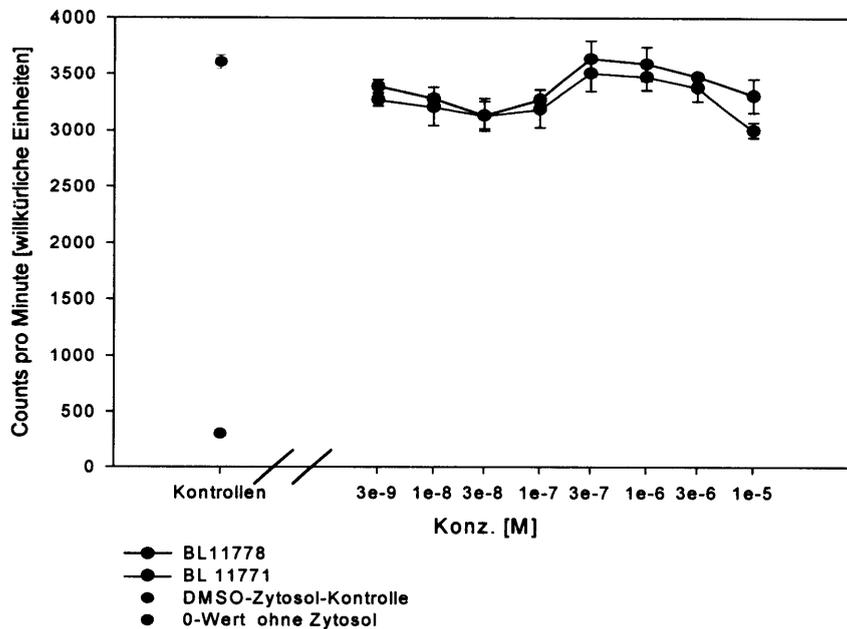
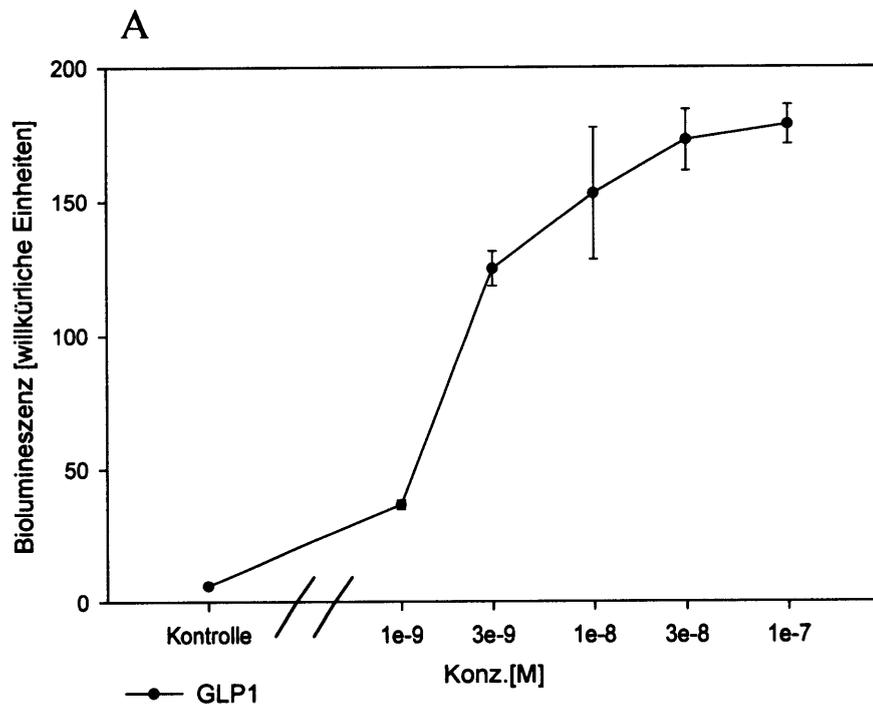


Abb.3-33: Nach Inkubation mit [³H]-cAMP, der jeweiligen Imidazolinverbindung und MIN 6 Zellhomogenat wurden Counts pro Minute gemessen. Nichtzyklisches AMP hat eine wesentlich höhere Affinität zu den Yttrium-Silicat beads als cAMP und somit auch ein größeres Signal als cAMP. BL 11282 und BL 11345 in (A), BL 11771 und BL 11778 in (B). Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Kurven je eines von 3 unabhängigen Experimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

3.4.2. Messung von cAMP Konzentrationsänderungen in HEK 293 Zellen

Ein weiterer Ansatz um Veränderungen der cAMP Konzentration durch Imidazoline festzustellen war der Luciferase-Aktivitätstest. Für den Versuch wurden mit dem CREB-Promotor transfizierte HEK 293 Zellen gewählt, bei denen GLP-1 durch Agonismus an G-Protein-gekoppelten GLP-1 Rezeptoren und nachfolgender Aktivierung der Adenylatzyklase ein deutliches Signal zeigte. Diese Zelllinie stammt von menschlichen Nierenzellen und führte bei GLP-1 Applikation zu einer statistisch signifikanten, konzentrationsabhängigen Zunahme der Biolumineszenzintensität von $6,28 \pm \text{SEM } 0,22$ in der Kontrolle auf $179 \pm \text{SEM } 7,5$ in Anwesenheit von GLP-1 in einer Konzentration von 100 nM. Die Naphtholimidazoline BL 11771 und BL 11778 sowie die Indolimidazoline BL 11282 und BL 11345 zeigten alle keine signifikante Erhöhung der Biolumineszenz. Bei den Imidazolinen wurde sogar eine leichte konzentrationsabhängige Abnahme der Biolumineszenz beobachtet. Neben dem durchgeführten SPA-Test auf PDE-Inhibition in MIN 6 Zellhomogenat mit negativem Ergebnis zeigte dieser Test, daß durch die verwendeten Imidazoline keine Erhöhung der cAMP- Spiegel in HEK 293 Zellen erreicht wird.



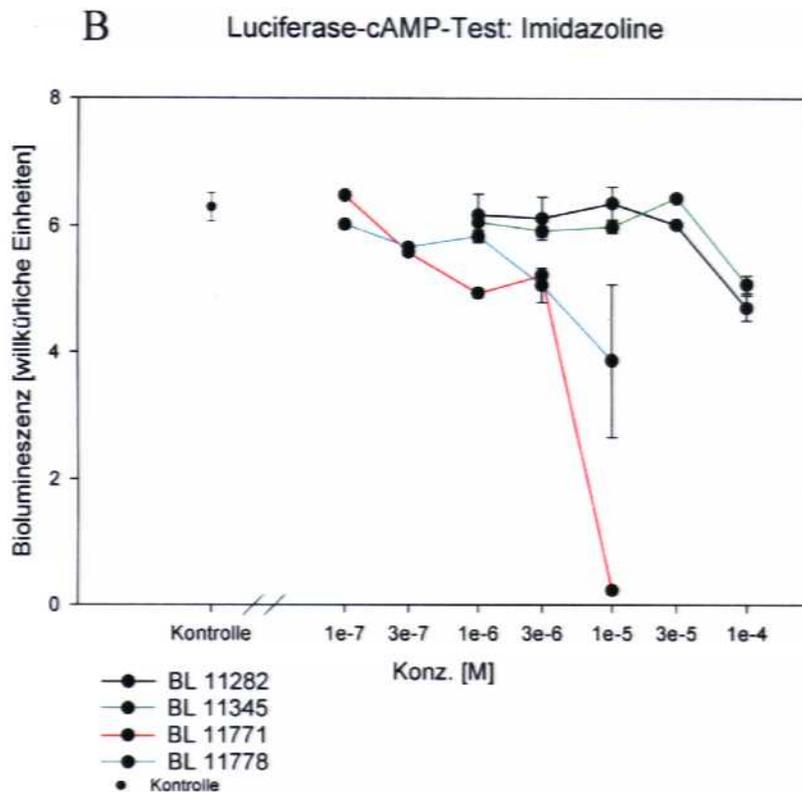


Abb.3-34: Die HEK 293 Zellen wurden in 100 μ l Wachstumsmedium 48 h inkubiert. Anschließend wurde gegen 100 μ l GLP-1 haltiges (A) bzw. imidazolinhaltiges (B) Wachstumsmedium gewechselt und 5 weitere Stunden inkubiert. Danach wurden 100 μ l Luciferase-Substratreagenz hinzugefügt und nach 15 Minuten bei 562 nm Emissionswellenlänge die Biolumineszenz gemessen. Jedem Meßpunkt liegt n=3 zugrunde, wobei die Kurven je eines von 3 unabhängigen Experimenten repräsentieren. Durchschnittswerte +/- SEM.

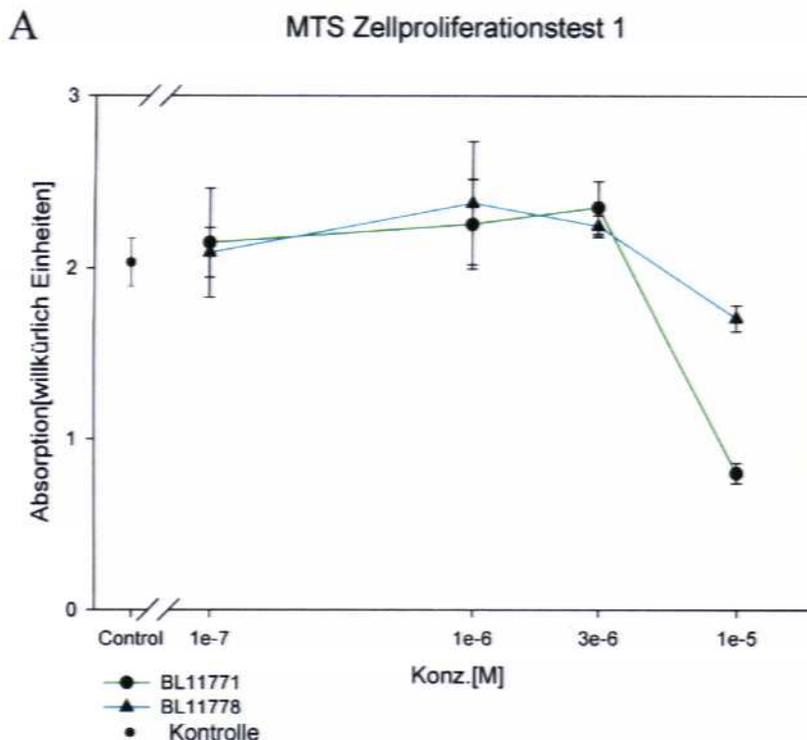
3.5. Untersuchungen zur Toxizität verschiedener Imidazoline in MIN 6 Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde vorwiegend mit MIN 6 Zellen gearbeitet, weil diese Zellen im Insulinfreisetzungsvoruch die eindeutigsten und größten Insulinfreisetzen bei entsprechender Substanzapplikation zeigten. Auffallend waren bei den im Abschnitt 3.1.1. beschriebenen Versuchen, daß bei sehr hohen Wirkstoffkonzentrationen zum Teil eine Reduktion der Insulinfreisetzung eintrat. Das Ausmaß der Reduktionen war sehr unterschiedlich und führte in manchen Fällen sogar zu einer Verminderung der Insulinfreisetzung unter den Kontrollwert.

Die genauen Gründe für einen solchen Verlauf in Konzentrations-Wirkungskurven sind nicht bekannt, aber toxische Einflüsse auf Zellen können auch eine Rolle spielen. Um auf toxische Wirkungen zu prüfen, wurde ein MTS-Zellproliferationstest durchgeführt.

3.5.1. Prüfung verschiedener Imidazoline auf Zytotoxizität durch den MTS-Test

MIN 6 Zellen wurden mit den Naphtholimidazolinen BL 11771 und BL 11778, den Indolimidazolinen BL 11282 und BL 11345 sowie mit Phentolamin und Idazoxan für 24 Stunden in phenolrotfreiem DMEM Wachstumsmedium inkubiert. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationsreihen gewählt. Danach wurde 3 Stunden mit MTS Reagenz inkubiert und anschließend bei 490 nm photometrisch die Konzentration an umgesetztem MTS bestimmt. Alle verwendeten Imidazoline zeigten bei ihren eingesetzten Höchstkonzentrationen eine signifikant verringerte Absorption im Vergleich zur Kontrolle. Diese Ergebnisse decken sich mit der parallel erfolgten Beobachtung, daß die Zellen sich bei den jeweils verwendeten Höchstkonzentrationen von den Mikrotiterplattenböden abkugelten. Eine zusätzlich durchgeführte Trypanblaufärbung zeigte eine Zellmortalität zwischen 90 und 95 %.



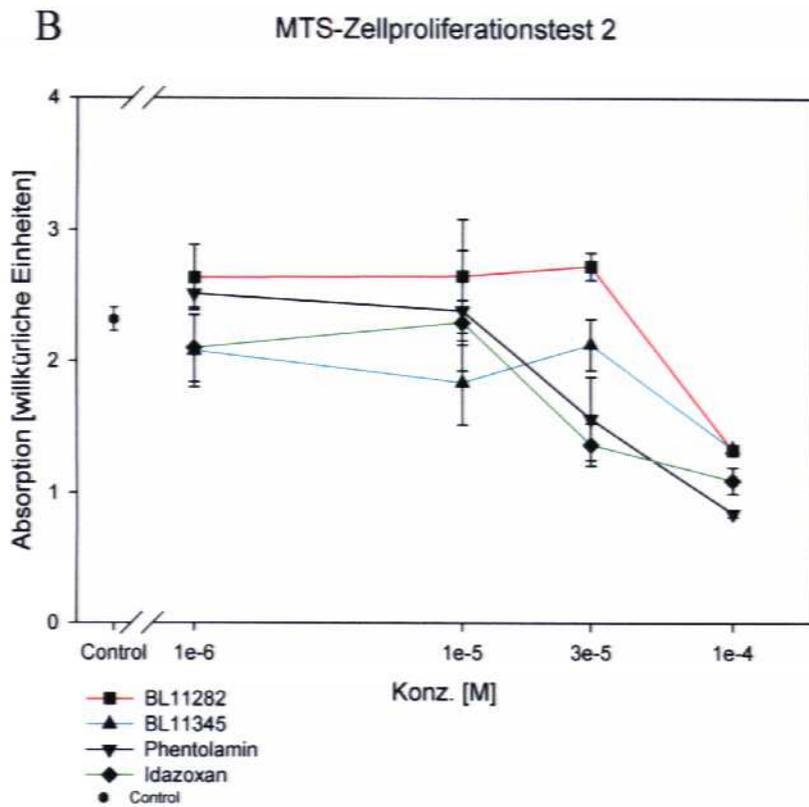


Abb.3-35: Die angegebenen Substanzen wurden 24 h mit MIN 6 Zellen in Wachstumsmedium in ansteigenden Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 h mit dem MTS-Reagenz inkubiert und danach bei 490 nm die jeweilige Absorption bestimmt, wobei eine große Absorption ein Zeichen für ausgeprägten Zellmetabolismus und Zellvitalität ist. Jedem Meßpunkt liegt $n=3$ zugrunde, wobei die Kurven je eines von 3 unabhängigen Experimenten repräsentieren. Durchschnittswerte \pm SEM.

4. Diskussion

Wie von verschiedenen Autoren bekannt ist, können bestimmte Imidazolinverbindungen Glukose-abhängig Insulin aus Beta-Zellen des Pankreas freisetzen (Mest et al., 2001; Rustenbeck et al., 1999). Sowohl in Beta-Zelllinien und Inselpräparationen als auch unter in-vivo Bedingungen konnte dieser Effekt für verschiedene Imidazolinverbindungen gezeigt werden. Der Wirkmechanismus der Imidazoline hinsichtlich der Insulinfreisetzung ist bislang nicht befriedigend geklärt. Zunächst wurde angenommen, daß nur Imidazolinverbindungen, die eine alpha-2 Rezeptorblockade vermitteln Insulin freisetzen können (Schulz und Hasselblatt, 1988). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß eine alpha-2 Rezeptorblockade für den Effekt der Insulinfreisetzung nicht erforderlich ist (Schulz und Hasselblatt, 1989). Andere Untersuchungen führten zur Erkenntnis, daß Imidazoline wie beispielsweise Phentolamin oder Efaroxan den K_{ATP} -Kanal in Beta-Zellen blockieren (Chapman et al., 1999; Chan et al., 1991). Es wurde in diesem Zusammenhang auch nach Bindungsstellen an diesem Kaliumionenkanal weiter gesucht und eine dann als I_3 bezeichnete Bindungsstelle gefunden (Proks und Ashcroft, 1997). Zuvor wurden durch Bindungsstudien mit radioaktiven Liganden Imidazoline Binding Sites (=IBS oder I-Sites) gefunden und ohne Kenntnis deren jeweiligen molekularen Strukturen als I_1 und I_2 Site definiert. Diese I-Sites wurden auch im Zusammenhang mit der Insulinfreisetzung von Imidazolinen diskutiert (Chan et al., 1997; Chan, 1998). Als für die Insulinfreisetzung verantwortliches molekulares Target schieden sie aber aus (Olmos et al., 1994). Es gibt Hinweise auf Imidazolinwirkungen, die weder mit einer K_{ATP} -Kanalblockade, noch mit einer alpha-2 Rezeptorblockade, noch einer anderen Wechselwirkung mit plasmamembranständigen Targets einhergehen (Zaitsev et al., 1996; Efanov, Zaitsev, Mest et al., 2001). Um die Frage der Wirkmechanismen von Imidazolinen weiter zu klären, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst Insulinfreisetzungsversuche durchgeführt, deren Ergebnisse hier diskutiert werden.

4.1. Insulinfreisetzung durch Imidazoline

4.1.1. Imidazoline, die zu einer Erhöhung der Insulinfreisetzung führen

Zunächst konnte für die Naphthol- als auch die Indolimidazoline eine Glukose-abhängige insulinfreisetzende Wirkung in MIN 6 Zellen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigten in der gleichen Zelllinie die Sulphonylharnstoffe Tolbutamid und Glibenclamid keine Glukose-abhängige insulinfreisetzende Wirkung. Die fehlende Glukose-abhängige Wirkung dieser und auch anderer Sulphonylharnstoffe ist von vielen anderen in vitro- und in vivo-Versuchen bekannt (Efanov et al., 1998; Ball et al., 2000) und deshalb war die Bestätigung der Wirkungen dieser Substanzen in MIN 6 Zellen zu erwarten. Bei den Imidazolinen sind neben den vielen bekannten Glukose-abhängig wirkenden Substanzen auch Glukose-unabhängig wirkende bekannt (Le Brigand et al., 1997). Dies ist ein Beispiel für die heterogenen Wirkungen der Imidazoline bezüglich der Insulinfreisetzung. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten neuen, bislang nur teilweise beschriebenen Imidazoline können somit hinsichtlich ihrer Wirkungsabhängigkeit der großen Imidazolingruppe mit Glukose-abhängiger insulinfreisetzender Wirkung zugeordnet werden. Hierzu gehören auch die als erste beschriebenen Imidazoline mit insulinfreisetzender Wirkung, Phentolamin und Efaroxan (Schulz und Hasselblatt 1988; Chan et al., 1991). Der Befund, daß die Kombination von Naphthol- und Indolimidazolin zu keinem additiven insulinfreisetzenden Effekt geführt hat gibt einen Hinweis auf den gleichen Hauptwirkmechanismus dieser beiden Imidazolinuntergruppen. Der Insulinfreisetzungsversuch mit dem Phorbolster PMA, einem hochpotenten PKC-Aktivator zeigte, daß MIN 6 Zellen eine Sekretionskapazität haben, die weit über der durch Imidazoline induzierten Insulinsekretion liegt. Der fehlende additive Effekt ist demnach nicht mit einer Erschöpfung des freisetzbaren Insulins in MIN 6 Zellen zu begründen. Außerdem konnte für BL 11771 in Kombination mit dem hochpotenten PKC-Aktivator PMA ein großer additiver insulinfreisetzender Effekt gezeigt werden, was darauf hindeutet, daß die durch das Imidazolin vermittelte Insulinfreisetzung nicht auf einer Aktivierung der Protein Kinase C (=PKC) beruht.

Um das Ausmaß der durch die neuen Imidazoline vermittelten Insulinfreisetzung in das Verhältnis zu den bereits aus der Literatur bekannten Imidazolinen setzen zu können, wurden auch von Phentolamin, Efaroxan, RX 871024 und anderen Verbindungen Insulinfreisetzungskurven erstellt. Die in der Literatur häufig beschriebenen Imidazoline Phentolamin, Efaroxan und RX 871024 zeigten im Vergleich zu den neuen Naphthol- und Indolimidazolinen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der maximalen Insulinfreisetzung. Dies läßt auf den gleichen Hauptwirkmechanismus sowie ähnliche intrinsische Aktivitäten der Substanzen schließen. Die ebenfalls als insulinfreisetzend bekannte Imidazolinverbindung Tolazolin lag hingegen signifikant unter deren Werten der Insulinfreisetzung. Über die Gründe der unterschiedlichen maximalen Insulinfreisetzung der eben genannten Imidazoline kann nach den derzeitigen Erkenntnissen nur spekuliert werden. Ein grundsätzlich anderer Wirkmechanismus scheint nicht vorzuliegen, da wie bei Naphthol- und Indolimidazolinen kein additiver Effekt in Kombinationsexperimenten zu beobachten war. Möglicherweise kann Tolazolin an dem in seiner Identität noch nicht bekannten, für die Insulinfreisetzung hauptverantwortlichen molekularen Imidazolintarget keine maximale intrinsische Aktivität entfalten.

Im Zusammenhang mit der Insulinfreisetzung durch Imidazoline sowie deren Bindungsstellen wurden in der Literatur auch vielfach die strukturell verwandten Guanidinderivate beschrieben (Molderings, 1997). Für die insulinfreisetzende Wirkung der Imidazoline wurde bislang unter anderem eine der Imidazoline Binding Sites (= I-Sites) I_1 und I_2 diskutiert, von denen alle Lokalisationen in der Zelle sowie der molekulare Aufbau noch nicht bekannt sind. In diesem Zusammenhang steht auch die Bedeutung der Clonidine Displacing Substance (=CDS), einer strukturell noch nicht bekannten physiologischen Substanz, die imstande ist an I-Sites zu binden und Insulin freizusetzen (Chan 1998). Agmatin, das decarboxylierte Arginin mit Guanidinstruktur wurde lange Zeit als Kandidat für die CDS angesehen. Da die insulinfreisetzende Wirkung von Agmatin aber nicht durch Applikation der I-Site Antagonisten RX 801080 und KU14R aufgehoben werden konnte (Chan et al., 1997), schied Agmatin als CDS aus. In der vorliegenden Arbeit wurden Agmatin wie auch Cimetidin, ein Guanidinderivat, in MIN 6 Zellen appliziert. Beide Guanidinderivate führten zu einer erhöhten Insulinfreisetzung, wobei das maximale Ausmaß der Insulinfreisetzung signifikant geringer als bei den parallel applizierten Naphthol- und

Indolimidazolinen war. Der Wirkmechanismus, über den die Insulinfreisetzung vermittelt wurde, scheint bei geringerer intrinsischer Aktivität der gleiche wie der von stark wirksamen Naphthol- und Indolimidazolinen zu sein, da wie bei dem schwach wirksamen Imidazolinderivat Tolazolin bei kombinierten Applikationen der Imidazoline keine additiven Effekte zu beobachten waren. Die Guanidinverbindung BTS 67582 wurde auf K_{ATP} -Kanalblockade untersucht (Dickinson et al., 1997) mit dem Ergebnis, daß die Substanz einen blockierenden Effekt an diesem Kanal vermittelt. Dies entspricht dem bisher am häufigsten beschriebenen Imidazolinwirkmechanismus bezüglich der Insulinfreisetzung (siehe oben) und untermauert einen gemeinsamen Wirkmechanismus von Imidazolin- und Guanidinderivaten.

Bei Desensitierungsversuchen mit 18 stündiger Präinkubation von MIN 6 Zellen mit Efaroxan und BL 11778 verschwanden die insulinfreisetzenden Wirkungen der verwendeten Imidazoline im darauffolgenden Standardfreisetzungsvorversuch. Interessanterweise kam es auch zum Wirkverlust bei Verwendung verschiedener Imidazoline während Präinkubationsphase und Stimulationsphase. BL 11778 Präinkubation führte beispielsweise zum Wirkverlust von BL 11778 und auch von BL 11345 in der Stimulationsphase. Efaroxan desensitisierte die Zellen für BL 11778 und BL 11345. Diese Befunde sprechen für einen gemeinsamen molekularen Angriffsort dieser Verbindungen mit Desensitierungserscheinungen nach längerem Substanzkontakt mit den jeweiligen Zellen. Für Efaroxan wurde ein Desensitierungseffekt in Beta-Zellen bereits beschrieben (Chapman et al., 1999).

Die Abhängigkeit der vollen Imidazolinwirkung von der Ca^{2+} Konzentration des Inkubationsmediums wurde unter verschiedenen Versuchsbedingungen gezeigt. Auffallend war die nach der Hungerphase unverzichtbare zeitgleiche Präsenz von 25 mM Glukose, 1,8 mM Ca^{2+} und Imidazolin in der Stimulationsphase. Der Versuch, durch einstündige Inkubation mit 25 mM Glukose und 1,8 mM Ca^{2+} einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration zu erreichen, der in einer anschließenden Imidazolininkubationsphase bei 25 mM Glukose und 0 mM Ca^{2+} eine unverminderte Insulinfreisetzung gewährleistet, schlug fehl. Offensichtlich führt der Wechsel von 1,8 mM zu 0 mM Ca^{2+} Konzentration im Inkubationsmedium zu einem dramatischen Abfall der zunächst durch Glukose erhöhten intrazellulären Ca^{2+} Konzentration, was eine volle Imidazolinwirkung unmöglich machte. Die Insulinfreisetzungskurven des

o.g. Versuchs ähnelten sehr stark den Versuchen mit ausschließlich 0 mM Ca^{2+} Konzentration im Inkubationsmedium.

Die Kombination von BL 11771 mit einer depolarisierenden KCl Konzentration von 25 mM führte in MIN 6 Zellen zu einem additiven Effekt. Dies spricht für zumindest eine depolarisationsunabhängige Wirkkomponente des Imidazolins. Ähnliche Befunde wurden für die Imidazolinverbindungen RX 871024 und BL 11282 beschrieben (Zaitsev et al., 1996; Efanov, Zaitsev, Mest et al., 2001).

Für eine volle Imidazolinwirkung war eine 60 minütige Inkubationsphase mit 25 mM Glukose notwendig. Wie bei o.g. Versuch mit 0 mM Ca^{2+} Konzentration wurde geprüft, ob eine einstündige, zunächst reine 25 mM Glukosestimulation zu einer Verkürzung der nachfolgenden, für eine unverminderte Insulinfreisetzung notwendigen Imidazolininkubationsdauer führt. Dabei zeigte sich auch die Unverzichtbarkeit der 60 minütigen Imidazolininkubationszeit, da in dem Versuch erst nach dieser Zeit die maximale Insulinfreisetzung erfolgte. Das bedeutet, daß neben einer dauerhaften Ca^{2+} - Konzentration von 1,8 mM die Imidazolininkubationszeit von 60 Minuten notwendig ist, um die maximale Insulinsekretion zu gewährleisten.

Präinkubationen von MIN 6 Zellen mit den Naphthol- und Indolimidazolin in der Hungerphase, nachfolgendem Waschen der Zellen und anschließender 25 mM Glukoseinkubation führte zu signifikant erhöhten Insulinfreisetzungen. Bei dem Naphtholimidazolin BL 11771 wurde sogar nach einminütiger Präinkubation eine größere Insulinfreisetzung als unter Standardbedingungen mit 60 minütiger Anwesenheit des Imidazolins im Zellmedium beobachtet. Dies deutet entweder auf eine extrem niedrige K_{off} -Rate der Substanzen von ihrem Bindungsort oder einen Priming-Effekt, bei dem nur ein sehr kurzer Kontakt der Zellen mit den Imidazolin erforderlich ist hin. Anzumerken ist, daß nach kurzer Imidazolinpräinkubation für eine volle Insulinfreisetzung wie im Standardversuch auch eine 60 minütige 25 mM Glukosestimulation erfolgen muß. Der Vergleich der Applikation von BL 11778 bis 100 μM unter Standardbedingungen und nach Präinkubation zeigte auch einen deutlichen Unterschied der Ausprägung einer Glockenform (=Bell shape) in der Insulinfreisetzungskurve. Während bei einstündiger Substanzanwesenheit bei 100 μM BL 11778 sogar eine deutliche Verminderung der Insulinfreisetzung unter die der 0-Kontrolle zu sehen war, zeigte sich bei der gleichen Konzentration, die nur eine

Minute in der Präinkubation vorlag eine deutliche Erhöhung der Insulinfreisetzung. Die dabei erreichten Maximalwerte lagen sogar höher als beim Standardversuch mit einstündiger Imidazolininkubation. Dies läßt auf toxische Effekte der Substanz bei zu langer Anwesenheit im Inkubationsmedium schließen. Für Idazoxan, Phentolamin und andere Imidazoline wurden bei hohen Substanzkonzentrationen und bestimmter Inkubationsdauer ebenfalls zytotoxische Effekte beschrieben (Mourtada et al., 2000).

4.1.2. Imidazoline, die zu einer Erniedrigung der Insulinfreisetzung führen

Neben Imidazolinverbindungen, die nach Applikation in Beta-Zellen die Insulinfreisetzung erhöhen gibt es auch Imidazoline, deren Applikationen eine Verminderung der Insulinfreisetzung zur Folge haben. Dies wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (Renström et al., 1996; Kampermann et al., 2000). Die hier getesteten Imidazoline Clonidin, Moxonidin, Oxymetazolin und Naphazolin haben alle eine alpha-2 agonistische Wirkung gemeinsam. Alleinige Applikation dieser Substanzen in MIN 6 Zellen resultierte immer in einer Verminderung der Insulinfreisetzung, wobei Kombination mit dem alpha-2 blockierenden Imidazolin Phentolamin zu einer durch alpha-2 Agonisten vermittelten konzentrationsabhängigen Steigerung der Insulinfreisetzung führte. Clonidin und Moxonidin bestätigten ihre insulinfreisetzende Komponente auch in Kombination mit dem alpha-2 blockierenden Alkaloid Yohimbin. Diese Versuche zeigten die Demaskierung eines stimulierenden, zusätzlichen Effekts dieser Imidazoline in Beta-Zellen. Präinkubationsversuche mit Pertussis Toxin (=PTX) bestätigten diese Ergebnisse noch weiter. Der Präinkubationsversuch mit PTX führte bei R-Adrenalin allerdings nur zu einer Aufhebung der Hemmung der Insulinfreisetzung. Die fehlende stimulierende Komponente des Propanolamins R-Adrenalin deutet deshalb auf einen demaskierten Insulinfreisetzungseffekt hin, der auf Substanzen mit Imidazolinstruktur beschränkt ist. Rustenbeck et al. haben 1997 ausführlich die K_{ATP} -kanalblockierenden Effekte verschiedener Guanidine und Imidazoline, einschließlich Clonidin beschrieben.

Interessanterweise zeigte eines der beschriebenen Experimente das Unvermögen von Tolbutamid, [³H] Clonidin von Beta Zellmembranen, deren alpha-Rezeptoren mit Noradrenalin abgesättigt waren zu verdrängen, und deutete auf unterschiedliche Bindungsstellen von Imidazolinen und Sulphonylharnstoffen am K_{ATP}-Kanal hin. Bezüglich der Bindung von insulinfreisetzenden Imidazolinen wie Phentolamin an K_{ATP}-Kanäle bestätigte eine andere Publikation eine als I₃ bezeichnete Bindungsstelle, die nicht der von Sulphonylharnstoffen entspricht (Proks und Ashcroft, 1997). Sowohl die insulinfreisetzenden, als auch die insulinfreisetzungshemmenden Imidazoline scheinen den gleichen Bindungsort am K_{ATP}-Kanal zu haben.

4.2. Untersuchungen der Imidazolinwirkungen auf das Membranpotential

4.2.1. Untersuchungen der insulinfreisetzenden Imidazoline auf Membranpotentialänderungen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Imidazoline hinsichtlich ihres Wirkmechanismus untersucht. Eine zentrale zu klärende Frage war die Beeinflussung des Zellmembranpotentials durch Imidazoline. Interessanterweise zeigte sich bei den neuen, in der Literatur noch unbeschriebenen Imidazolinen ein uneinheitliches Bild bezüglich dieser Frage. Die Naphtholimidazoline BL 11771 und BL 11778 führten in MIN 6 Zellen zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Zelldepolarisation, wohingegen die Indolimidazoline BL 11282 und BL 11345 sogar in einer Konzentration von 10 µM keine depolarisierenden Effekte zeigten. Da die Indolimidazoline mit 10µM nah an den Konzentrationen ihrer maximalen Effekte bezüglich der Insulinfreisetzung in MIN 6 Zellen liegen und erst bei 100 µM eine erste Tendenz der Depolarisation zu sehen war, kann eine Depolarisation der Indolimidazoline als Wirkmechanismus bezüglich der Insulinfreisetzung ausgeschlossen werden. Bei den Naphtholimidazolinen ergaben genauere Untersuchungen, daß die EC₅₀ der Depolarisation des Imidazolins BL 11771 um ca. den Konzentrationsfaktor 10 über der EC₅₀ der Insulinfreisetzung lag. Dies war ein

erster Hinweis auf einen zusätzlichen, von der K_{ATP} -Blockade unabhängigen Effekt dieser Substanz, der vermutlich dem Haupteffekt der nicht depolarisierenden Indolimidazoline gleicht. Untersuchungen von Efanov, Zaitsev, Mest et al., 2001 zeigten für BL 11282, daß in pankreatischen Beta-Zellen der Ratte bei Konzentrationen bis 50 μM keine Zelldepolarisation erfolgte und daß diese Konzentration des Indolimidazolins auch zu keinem Einstrom von Ca^{2+} Ionen in die Beta-Zellen führte. Außerdem wurden bei Applikation depolarisierender KCl-Konzentrationen zusätzliche Insulinfreisetzungseffekte durch BL 11282 in pankreatischen Beta-Zellen der Ratte gezeigt. In elektropermeabilisierten Beta-Zellen zeigte BL 11282 bei fest eingestellter Ca^{2+} Ionenkonzentration, daß in Anwesenheit des Imidazolins eine signifikante Steigerung der Insulinfreisetzung erfolgte. Ein vergleichbares Experiment wurde für RX 871024 bereits von Zaitsev et al. 1996 beschrieben. RX 871024 zeigte wie BL 11282 in permeabilisierten Zellen mit fest eingestellter Ca^{2+} Ionenkonzentration eine signifikante Steigerung der Insulinfreisetzung. Ein wichtiger Unterschied zwischen BL 11282 und RX 871024 ist die unterschiedliche depolarisierende Wirkung. Während BL 11282 wie bereits erwähnt in pankreatischen Beta-Zellen der Ratte sowie in MIN 6 Zellen bei stark insulinfreisetzenden Substanzkonzentrationen keine depolarisierenden Effekte zeigte, konnte für RX 871024 bei Konzentrationen, die auch zu einer signifikanten Insulinfreisetzung führten ein depolarisierender Effekt gezeigt werden (Zaitsev et al., 1996). Nach allen hier angeführten bekannten Ergebnissen bezüglich der Imidazolineffekte in Beta-Zellen stellt sich die Frage, inwieweit der depolarisierende Effekt von Imidazolinen, wenn vorhanden, eine entscheidende Rolle für die Insulinfreisetzung spielt. Die Unterschiede der Imidazolineffekte beschränken sich nicht nur auf die Depolarisationseigenschaften, denn es gibt auch beispielsweise bezüglich der Glukoseabhängigkeiten der Imidazolinwirkungen Unterschiede. Die oben diskutierten Imidazoline zeichnen sich alle durch eine Glukose-abhängige insulinfreisetzende Wirkung sowohl in Beta Zellversuchen als auch in in-vivo Versuchen aus. Es wurden jedoch z.B. die Imidazoline S 22068 und S 21663 beschrieben, die in MIN 6 Zellen eine ausgeprägte insulinfreisetzende Wirkung hatten, ohne dabei eine Abhängigkeit der Imidazolinwirkung von der Glukosekonzentration zu zeigen (Le Brigand et al., 1997; Le Brigand et al., 1999). Außerdem zeigte sich bei S 21663, daß ein beobachteter depolarisierender Effekt der

Substanz über einen K^+ Ionenkanal, der sich vom K_{ATP} -Kanal unterscheidet vermittelt wird. Die soweit beschriebenen Imidazolinwirkungen bezüglich der Insulinfreisetzung aus Beta-Zellen sind sehr vielfältig. Bei den Imidazolinen, die bekanntlich nicht depolarisierend wirken, ist ein von der Depolarisation unabhängiger Wirkmechanismus eine logische Konsequenz. Bei allen bislang in der Literatur beschriebenen Imidazolinen mit depolarisierender Aktivität wurde nur teilweise auf zusätzliche, depolarisationsunabhängige Effekte durch Kombinationsversuche mit KCl sowie mit permeabilisierten Zellen und fest eingestellter Ca^{2+} Ionenkonzentration geprüft. Auffallend ist jedenfalls, daß alle solche bislang beschriebenen durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß bei den jeweiligen Imidazolinen zusätzliche, depolarisationsunabhängige Effekte vorhanden waren. Es findet sich keine in der Literatur beschriebene insulinfreisetzende und depolarisierende Imidazolinverbindung, die nachweislich keine der o.g. zusätzlichen depolarisationsunabhängigen Effekte hatte. Bei den oben geschilderten Versuchen wurde nur auf additive Effekte der Insulinfreisetzung zusätzlich zu den durch Depolarisation vermittelten Freisetzungseffekten geprüft. Ein anderer Ansatz zur Klärung der Bedeutung der Depolarisation von Imidazolinen hinsichtlich Insulinfreisetzung ist die Ausschaltung der Mechanismen, die eine Depolarisation durch Imidazoline vermitteln. Viele in dieser Richtung durchgeführten und in der Literatur beschriebenen Experimente sind bezüglich Aussagekraft zum Teil jedoch sehr kritisch zu beurteilen. Der vielfach verwendete K_{ATP} -Kanalöffner Diazoxid inhibiert beispielsweise die K_{ATP} -Kanalblockade, die durch bestimmte Imidazoline vermittelt wird, verhindert aber zugleich die K_{ATP} -kanalabhängige, depolarisierende Wirkkomponente der bei den Glukose-abhängig wirkenden Imidazolinen zusätzlich applizierten Glukose. Durch Diazoxidapplikation kommt es demnach zu einer Beeinträchtigung der Wirkung von ATP, das aus dem Glukosemetabolismus stammt und in Abhängigkeit der Diazoxidkonzentration zu einer verminderten oder ganz fehlenden Depolarisation durch Glukose bzw. daraus gebildetem ATP. Dadurch können zusätzlich zur depolarisierenden Wirkung von Imidazolinen vorhandene Imidazolinwirkungen leicht maskiert werden, weil der für die Insulinsekretion nötige Ca^{2+} Ioneneinstrom durch unzureichende oder fehlende Zelldepolarisation in jedem Fall verringert wird oder ausbleibt. Werden in Anwesenheit von Diazoxid und nachweislich erfolgter Zellhyperpolarisation trotzdem zusätzliche Effekte beobachtet,

so ist dies trotz o.g. Problematik ein möglicher Hinweis für einen depolarisationsunabhängigen Zusatzeffekt von Imidazolinen. Wiederholt soll nochmals betont werden, daß aus o.g. Gründen hingegen bei Beobachtung von fehlenden zusätzlichen Effekten die umgekehrte Folgerung nur bedingt möglich ist. Obgleich in der Literatur viele Experimente mit Diazoxid in Kombination mit Imidazolinen beschrieben sind, wurde in der vorliegenden Arbeit wegen oben dargestellter Problematik auf diese Versuche verzichtet. Ein anderer Ansatz zur Klärung der Bedeutung der Zelldepolarisation durch Imidazoline hinsichtlich einer Insulinfreisetzung wurde kürzlich beschrieben. Dabei wurden pankreatische Beta-Zellen von SUR 1 Knockout-Mäusen und die Imidazolinverbindung RX 871024 verwendet (Efanov, Hoy et al., 2001). Diese Mäuse exprimieren keine SUR 1 Rezeptoren. Der SUR 1 Rezeptor reguliert sowohl die Leitfähigkeit als auch die Lokalisation des K_{ATP} -Kanals innerhalb der Plasmamembran. In Abwesenheit von SUR 1 verhindert das Endoplasmatische retikulum (=ER) Retentionssignal auf Kir6.2 dessen Abtransport aus dem ER und somit gelangen keine funktionsfähigen K_{ATP} -Kanäle in die Plasmamembran. Wenn SUR 1 wie in normalen Zellen vorhanden ist, neutralisiert es das Retentionssignal und der SUR 1/Kir6.2 Komplex (= K_{ATP} -Kanal) kann in die Plasmamembran abtransportiert werden. Die Applikation von RX 871024 in Beta-Zellen von SUR 1 Knockout-Mäusen führte im Vergleich zur Applikation in Beta-Zellen normaler Mäuse zu keiner Reduktion des Erhöhungsfaktors der Insulinfreisetzung bei einer Glukosekonzentration von 17 mM. Die Absolutfreisetzungen waren bei den SUR 1 Knockout-Zellen bei 17 mM Glukosekonzentrationen niedriger als in den normalen Zellen. Dies ist allerdings auf das Unvermögen von Glukose zurüchzuführen, in SUR 1 Knockout-Zellen effektiv Insulin freizusetzen. Für Phentolamin, einem weiteren Imidazolin, wurden in dem Experiment mit SUR 1 Knockout Zellen ähnliche Ergebnisse erhalten. Diese Publikation stützt durch einen interessanten experimentellen Ansatz die Erkenntnis, daß die insulinfreisetzenden Wirkungen bestimmter K_{ATP} -kanalblockierender Imidazoline zum größten Teil auf K_{ATP} -kanalunabhängige Effekte zurückzuführen sind.

Eine wichtige und fundamentale hier beschriebene Entdeckung ist die Existenz von den nicht-depolarisierenden, Glukose-abhängig insulinfreisetzenden Imidazolinen BL 11282 und BL 11345. Dadurch konnte ohne eine Zellmanipulation mit SUR 1

Knockout und ohne Applikation von Diazoxid oder anderen Substanzen gezeigt werden, daß bestimmte Imidazoline ohne eine durch sie vermittelte K_{ATP} -Kanalblockade Insulin aus Beta-Zellen freisetzen können. Die Kombination von depolarisierender und nicht depolarisierender Imidazolinverbindung führte im Vergleich zur jeweils separaten Substanzapplikation zu keiner erhöhten Insulinfreisetzung in MIN 6 Zellen. Das depolarisierende Imidazolin BL 11771 führte bei kombinierter Applikation mit 25 mM KCl zu einer zusätzlichen, konzentrationsabhängigen Insulinfreisetzung, was das Vorhandensein einer zur Depolarisation zusätzlichen Wirkung von BL 11771 bestätigte. Diese Ergebnisse liefern zusammen den Hinweis auf den gleichen, K_{ATP} -kanalunabhängigen Wirkmechanismus von depolarisierenden und nicht-depolarisierenden Imidazolinverbindungen. Außerdem zeigen die Ergebnisse, daß die bei BL 11771 vorhandene Depolarisation ein für das Ausmaß der Insulinfreisetzung nicht relevanter Zusatzeffekt zu dem K_{ATP} -kanalunabhängigen Wirkmechanismus darstellt. Die in dieser Arbeit beschriebenen neuen Erkenntnissen über die Wirkungen bestimmter Imidazoline lassen sich nicht zwangsläufig auf alle anderen insulinfreisetzenden Imidazoline übertragen. Die Substanzklasse oder der Begriff 'Imidazoline' umfasst auch Verbindungen mit im Vergleich zu den hier untersuchten Verbindungen unterschiedlichen Wirkkomponenten. So zeigten beispielsweise, wie bereits erwähnt, die zwei Imidazoline S 22068 und S 21663 eine Insulinfreisetzung in MIN 6 Zellen, die aber jeweils nicht in Abhängigkeit zur Glukosekonzentration stand (Le Brigand et al., 1997; Le Brigand et al., 1999).

4.2.2. Untersuchung der insulinfreisetzungshemmenden Imidazoline auf Membranpotentialänderungen

Die alpha-2 Agonisten Clonidin und Moxonidin sowie der unselektive alpha Agonist Oxymetazolin zeigten in der vorliegenden Arbeit in MIN 6 Zellen eine hyperpolarisierende Wirkung. Dieser Effekt wird vermutlich über die Öffnung unspezifischer Kationenkanäle gesteuert und nicht über die Öffnung von K_{ATP} -Kanälen (Abel et al., 1996). Inwieweit die hyperpolarisierende Wirkung dieser

Substanzen für das Ausmaß der Hemmung der Insulinfreisetzung überhaupt von entscheidender Bedeutung ist bleibt allerdings fraglich. In perforierten Beta-Zellen zeigte intrazellulär appliziertes Clonidin bei Kapazitätsmessungen noch immer eine Inhibition der Insulinfreisetzung, die offensichtlich über eine Aktivierung der Phosphatase Calcineurin gesteuert wurde, da die Kombination mit Calcineurin Inhibitory Peptide (=CIP) zu einer Aufhebung der hemmenden Clonidinwirkung führte (Renström et al., 1996). Lang et al. zeigten 1995 in ihrer Publikation eine über G_i Proteine vermittelte inhibitorische Wirkung von R-Adrenalin, die auch noch in durch Streptolysin-O (=SLO) permeabilisierten Beta-Zellen zu beobachten war. Dies deutete auf einen eng gekoppelten und nicht über im Zytosol diffundierende Second Messenger vermittelten Wirkmechanismus hin.

Präinkubationen von MIN 6 Zellen mit PTX führte wie unter 4.1.2. angesprochen zu einer Wirkumkehr der alpha-2 agonistischen Imidazoline bezüglich der Insulinfreisetzung mit einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Insulinfreisetzung in MIN 6 Zellen. PTX präinkubierte Zellen zeigten auch eine Wirkumkehr der alpha-2 agonistischen Imidazoline bezüglich des Zellpotentials. So wurde durch PTX- Präinkubation die bei den verwendeten Substanzen Clonidin und Moxonidin eigentlich typische Hyperpolarisation in eine leichte Depolarisation umgekehrt. Interessanterweise wurde das Membranpotential bei R-Adrenalinapplikation in den PTX präinkubierten Zellen nur soweit beeinflusst, daß das Membranpotential unverändert blieb und keine Hyperpolarisation mehr zu beobachten war. Die Ergebnisse der Insulinfreisetzung sowie der Membranpotentialsmessung korrelieren somit auch bei R-Adrenalin, wobei durch PTX Präinkubation keine Wirkumkehr, sondern aufgrund der fehlenden K_{ATP} -kanalblockierenden Komponente von R-Adrenalin nur der Verlust der hemmenden Wirkung auf die Insulinfreisetzung beobachtet wurde. Trotz der angesprochenen vorhandenen Korrelation zwischen der Insulinfreisetzung sowie des Membranpotentials in PTX unbehandelten und PTX behandelten Zellen könnte auch bei den alpha- und alpha-2 agonistischen Imidazolinen wie bei den in 4.2.1. angesprochenen Naphthol- und Indolimidazolinen ein weiterer, K_{ATP} -kanalunabhängiger Wirkmechanismus der Insulinfreisetzung vorhanden sein.

4.3. Untersuchungen der Imidazolinbindungsorte mittels CLSM und Fluoreszenzmarkierung

Ziel innerhalb dieser Arbeit war es vor allem, die neuen zur Verfügung stehenden Imidazoline weiter zu untersuchen. Die beiden Naphtholimidazoline BL 11771 und BL 11778 erwiesen sich im Verlauf der Untersuchungen als fluoreszenzaktiv. Diese Fluoreszenzaktivität konnte für umfangreiche Confokale Laserscanning Mikroskopien genutzt werden. Zunächst war interessant, daß die beiden Imidazoline in MIN 6 Zellen ein punktuell Färbemuster zeigten. Diese punktuelle Anfärbung des Zellinneren war eine Voraussetzung, um genauere Bindungsorte der Imidazoline in MIN 6 Zellen durch Mikroskopie sichtbar machen zu können. Ein weiterer Schritt war die Aufklärung der Identität der durch Imidazoline punktuell angefärbten Strukturen. Dabei führten die Untersuchungen zu der Verwendung des Zn^{2+} -Indikators Newport Green, um in nicht permeabilisierten, intakten MIN 6 Zellen die in Insulingranula überschüssigen Zn^{2+} Ionen und somit indirekt Insulin nachzuweisen. In diesem Zusammenhang konnte die Colokalisation von Naphtholimidazolinen und Insulingranula nachgewiesen werden. Auffallend war auch, daß beim Scannen der Zellen die Granuladichte von Schicht zu Schicht sehr unterschiedlich war. In manchen Zellschnitten konnten überhaupt keine Granulaanfärbungen beobachtet werden, wohingegen andere Zellschichten innerhalb der selben Zelle eine sehr hohe Verteilungsdichte zeigten. Diese polare intrazelluläre Granulaverteilung ist ebenfalls typisch für Insulingranula in Beta-Zellen (Asada et al., 1998) und bestätigt zusätzlich die Identität der durch Imidazoline angefärbten Strukturen. Außerdem konnten die CLSM Aufnahmen mit fluoreszenzmarkiertem Glibenclamid die Ergebnisse von Barg et al. von 1999 bestätigen, nach der Sulphonylharnstoffe an granuläre Strukturen in der Beta-Zelle binden. Auch das Verteilungsmuster der durch Glibenclamid-FL/-TR angefärbten Granula ähnelt denen bei durch Imidazoline erhaltenen Aufnahmen. Die Durchmesser der Granula von 200-500 nm wurden beim Scannen auch wie in der 2 dimensional Aufsicht bestätigt. In einem Scan mit eingestellten Schichtdicken von je 200 nm konnte beobachtet werden, wie einige Granula nach einem Scansprung von 200 nm, andere nach zwei oder spätestens drei Scansprüngen in die nächste Zellschicht der selben Zelle verschwanden, während andere Granula neu auftauchten.

Die Membran von Insulingranula hat von allen intrazellulären Membranen die größte strukturelle Verwandtschaft mit der Plasmamembran. Auch die in der Granulamembran eingeschlossenen Proteine haben in der Plasmamembran die größte Wiederfindungsrate. Ein sowohl in der Granulamembran wie auch in der Plasmamembran vorkommendes Protein ist der SUR 1/Kir6.2 Komplex (=K_{ATP}-Kanal). Das Ionenkanalprotein wurde in der Membran von Insulingranula nachgewiesen (Ozanne et al., 1995; Barg et al., 1999). Ein Interpretationsansatz für den depolarisationsunabhängigen Wirkmechanismus der neuen, bislang unbeschriebenen Imidazoline könnte nach o.g. Erkenntnissen ein Angriff der Imidazoline am K_{ATP}-Kanal der Granulamembran sein. Unter Miteinbeziehung der Publikation von Efanov, Hoy et al. 2001 über die unverminderten insulinfreisetzenden Wirkungen der Imidazoline RX 871024 und Phentolamin in SUR 1 Knockout-Maus Beta-Zellen mit nicht vorhandenem K_{ATP}-Kanalprotein erscheint dies jedoch eher unwahrscheinlich. In Alpha-Zellen, die zellphysiologisch eng mit Beta-Zellen verwandt sind, wurde für Tolbutamid eine glukagonfreisetzende Wirkung beschrieben (Hoy et al., 2000). Die Wirkung wurde auf die Blockade von mitochondrial-like K_{ATP}-Kanälen der Glukagongranulamembran zurückgeführt, was einen verminderten K⁺ Ausstrom über den Ionenkanal aus Glukagongranula zur Folge hatte. In der Publikation über Tolbutamid wurde im Zusammenhang der mitochondrial-like K_{ATP}-Kanalblockade über die mögliche Bedeutung von granulären H⁺/K⁺ Pumpen diskutiert, deren Aktivität zu einem K⁺ Ausstrom aus den Granula und einem H⁺ Einstrom in die Granula führt. Eine pH Erniedrigung sorgt wie in Beta-Zellen für eine Hormongranulareifung (s.u.). Omeprazol wurde bezüglich Insulinfreisetzung getestet und beschrieben. Dabei zeigte die als H⁺/K⁺ Pumpenblocker bekannte Substanz (Mattsson et al., 1991) in einer Konzentration von 100 µM eine im Vergleich zur Kontrolle Verdreifachung der Insulinfreisetzung in MIN 6 Zellen. Inwieweit die insulinfreisetzende Wirkung von Omeprazol in MIN 6 Zellen in den Zusammenhang der Granulaazidifizierung wie bei Tolbutamid gebracht werden kann ist fraglich, aber die zellphysiologische Verwandtschaft zwischen Alpha- und Beta-Zelle läßt zumindest gewisse Vergleiche von Wirkmechanismen zu und demnach könnte eine Granulaazidifizierung tatsächlich zu einer erhöhten Hormonfreisetzung führen. Für einen granulären Angriffsort spricht, daß Omeprazol nur im sauren Milieu in seinen pharmakologisch aktiven Metaboliten biotransformiert wird (Roth und Fenner, 2000).

Innerhalb der Beta-Zelle sind neben Lysosomen typisch saure Zellkompartimente Insulingranula, in denen ein entsprechendes Milieu gewährleistet ist. Der Wirkort von Omeprazol in MIN 6 Zellen befindet sich vermutlich an auf der Innenseite von Insulingranulamembranen vorkommenden Protonenpumpen (Orci et al., 1994). Durch Blockade dieser Protonenpumpen könnte der Protonenausstrom aus den Granula verringert werden. Dies führt zu einer Erniedrigung des pH Wertes in den Insulingranula und zu deren Reifung. Eine Parallele des möglichen Wirkmechanismus von Tolbutamid in Alpha-Zellen zu den nicht depolarisierenden Imidazolinen in Beta-Zellen zu ziehen ist schwierig, da der o.g. Wirkung von Tolbutamid eine Blockade von K^+ Kanälen zugrundeliegt. Zwar ist bei diesem granulären Angriff fern der Plasmamembran keine Zelldepolarisation für die Wirkung notwendig, aber aufgrund der vermutlich gleichen Struktur von K_{ATP} -Kanälen der Plasmamembran und K_{ATP} -Kanälen der Insulingranula würden die nicht K_{ATP} -kanalblockierenden Indolimidazoline als aktive Liganden an den granulären K_{ATP} -Kanälen ausscheiden. Es wurde allerdings auch schon über Imidazolinwirkungen diskutiert, die über eine Bindung an den putativen I_3 Rezeptor des Kanalproteins Kir6.2 mit nachfolgender intrazellulärer Signaltransduktion ohne Kanalblockade und Membranpotentialänderung laufen könnten (Morgan et al., 1999). Dies wäre ein Signalweg, bei dem auch eine über die I_3 Bindungsstelle vermittelte Wirkung der nicht depolarisierenden Imidazoline schlüssiger erklärt werden könnte. Es fehlt jedoch ein konkretes Beispiel einer Substanz in der Literatur für o.g. Signalweg, weshalb hierauf nicht weiter eingegangen wird. Für die Imidazoline Phentolamin und RX 871024 haben Hoy et al. 2001 eine die Glukagonfreisetzung hemmende Wirkung in Alpha-Zellen beschrieben. Interessanterweise wurde dieser Effekt auf einen Angriff der Imidazoline an ein granulamembranassoziiertes G_i Protein zurückgeführt. Die durch CLSM entdeckte Colokalisation von Imidazolinen mit Insulingranula in MIN 6 Zellen und das eben angesprochene Imidazolintarget geben einen Hinweis darauf, daß in den zellphysiologisch mit Alpha-Zellen verwandten Beta-Zellen ein molekulares Target von Imidazolinen ebenfalls an den Hormongranula lokalisiert ist. Für das Sulphonylharnstoffderivat Tolbutamid wurden wie für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Imidazoline Hinweise auf einen intrazellulären Angriffsort in Beta-Zellen geliefert (Barg et al., 1999). Demnach bindet Tolbutamid an den SUR 1 Rezeptor der Membranen von Insulingranula. Der SUR 1 Rezeptor tritt in

Wechselwirkung mit einem 65 kDa Protein, das die Leitfähigkeit eines in räumlicher Nähe befindlichen Chloridkanals erhöht. Durch Einströmen von Chloridionen in die Insulingranula kommt es parallel zu einem Protoneneinstrom, der den Zuwachs an negativen Ladungen in den Granula ausgleicht. Durch die Azidifizierung wird der Reifungsprozeß der Insulingranula und schließlich die Insulinexozytose verstärkt. Die Umwandlung von Proinsulin in Insulin hängt von der Aktivität der entsprechenden Konversionsenzymen ab (Orci et al., 1994; Furukawa et al., 1999). Diese Enzyme haben ihr pH-Optimum im sauren Milieu. Deshalb ist eine Azidifizierung der Granula für eine effiziente Insulinbildung aus Proinsulin notwendig. Das 65 kDa Protein wurde durch den Antikörper JSB-1 detektiert. Dieser Antikörper wurde ursprünglich gegen ein Multidrug-Resistance (=MDR) Protein gebildet. Aus diesem Grund wurde das Protein in der Publikation auch als MDR-like 65 kDa Glykoprotein bezeichnet. Möglicherweise greifen die Imidazoline an dieses 65 kDa Protein oder an andere in diesem Zusammenhang stehende Proteine bzw. Bindungsstellen an. Eine Beeinflussung der Öffnungswahrscheinlichkeit des genannten Chloridkanals durch Bindung von Imidazolinen ist ein Beispiel. Es gibt noch eine Reihe anderer im Zusammenhang mit der Insulinfreisetzung wichtige Proteine, die in der Insulingranulamembran lokalisiert bzw. mit dieser assoziiert sind. Die Calcium-Calmodulin abhängige Protein Kinase II (=CaM Kinase II) ist ein solches Protein (Easom, 1999). Dieses Enzym steuert u.a. die Phosphorylierungsschritte von Proteinen, die vermutlich die Bewegung, das Andocken sowie die Fusion von Insulingranula vermitteln (Gromada et al., 1999; Eliasson et al., 1997). Diese Proteine schließen Synapsin I, Mikrotubuli-assoziiertes Protein-2 (=MAP 2), N-ethylmaleimid-sensitives Fusionsprotein (=SNAP), Vesikel assoziiertes Membranprotein (=VAMP/Synaptobrevin), alpha-SNAP, SNAP 25 und Synaptotagmin mit ein. In diesem Zusammenhang wurde auch die Erhöhung der durch Tolbutamid-vermittelten Insulinfreisetzung nach Überexpression der CaM Kinase II in MIN 6 Zellen beschrieben (Tabuchi et al., 2000). Die Aktivität der CaM Kinase II wurde dabei durch Tolbutamid, jedoch auch durch depolarisierende KCl Konzentrationen erhöht. Unter Berücksichtigung der Publikation des granulären MDR-like Proteins stellt sich die Frage, ob die Aktivierung der CaM Kinase II im Falle von Tolbutamid über Wechselwirkung mit dem granulären SUR 1 Rezeptor/MDR-Protein oder wie bei KCl

über einen einer Depolarisation folgenden Ca^{2+} Einstrom in die Beta-Zelle vermittelt wird. Über den Angriffsort der Imidazoline im Zusammenhang mit der CaM Kinase II kann ebenfalls nur spekuliert werden. Die Annahme einer direkte Beeinflussung der CaM Kinase II kann durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Colokalisation der Naphtholimidazoline mit diesem Enzym jedoch gestützt werden. Aufgrund der Colokalisation könnte der Insulinfreisetzung außerdem eine Wechselwirkung der Imidazoline mit einem der o.g. durch die CaM Kinase II-regulierten Proteine zugrundeliegen.

Die Glukokinase ist ein für die Glukose-abhängige Insulinfreisetzung wichtiges Enzym. In MIN 6 Zellen wurde für die Glukokinase wie für die CaM Kinase II eine Colokalisation mit Insulingranula beschrieben (Stubbs et al., 2000). Die Glukokinase hat in Beta-Zellen ein anderes subzelluläres Verteilungsmuster wie in Hepatozyten. In Leberzellen findet bei Anflutung von hohen Glukosekonzentrationen eine Dissoziation der Glukokinase von ihrem regulierenden Protein statt und beinhaltet Translokation von sowohl Glukokinase als auch Regulatorprotein vom Zellkern zum Zytoplasma. Dieser Mechanismus ist mit verantwortlich für die große Glukosemetabolisierungskapazität von Leberzellen, weil durch diesen räumlichen Wechsel auch eine Enzymdegradation verringert wird. Für Beta-Zellen gibt es gesicherten Befunde einer anderen subzellulären Verteilung der Glukokinase sowie auf das Fehlen der räumlichen Wechsel des Enzyms in Abhängigkeit der Glukosekonzentration. Außerdem gibt es keine sicheren Hinweise auf die Existenz eines Glukokinase-Regulationsproteins wie in Leberzellen. Die Glukokinase findet man in MIN 6 Zellen großteils mit Insulingranula colokalisiert. Im Gegensatz zu der Verstoffwechslung großer Glukosemengen in Leberzellen scheint die sinnvolle Funktion der Glukokinase in Beta-Zellen eine Art Glukosesensor zu sein. Stubbs et al. gehen in der Publikation auch auf die vorher angesprochene Azidifizierung der Insulingranula im Zusammenhang mit der Insulinfreisetzung ein. Demnach könnte der Grund für die Präsenz der Glukokinase auf Insulingranula die dort benötigte Energie für die H^+ ATPasen und/oder die Ca^{2+} ATPasen sein. Um durch Glukosemetabolismus am Ort des ATP-Bedarfs und vor allen Dingen um eine schnelle Insulinausschüttung gewährleisten zu können erscheint diese Lokalisation auch physiologisch sinnvoll. Ein niedriger intragranulärer pH Wert ist für die Reifung der Insulingranula inklusive der Konversion von Proinsulin zu Insulin notwendig. Die Bedeutung von

intragranulärem Ca^{2+} ist noch nicht vollständig geklärt. Tabuchi et al. publizierten 2000, daß für die Insulinfreisetzung in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran eine erhöhte Ca^{2+} Konzentration erforderlich ist, die durch Annäherung von Ca^{2+} reichen Insulingranula erzeugt werden könnte. Scheenen et al. haben 1998 die Notwendigkeit einer erhöhten intragranulären Ca^{2+} Konzentration für eine optimale Exozytose beschrieben und bestätigt. Dabei wurde auch zwischen dem sauren und nicht-sauren Ca^{2+} Pool differenziert, wobei der saure Ca^{2+} Pool von Lysosomen, Endosomen, Trans-Golgi-Netzwerk sowie im Fall der Beta-Zelle hauptsächlich von Insulingranula repräsentiert wird. Es wurde dabei festgestellt, daß eine durch Ionomycin vermittelte Erniedrigung der intragranulären Ca^{2+} Konzentration im Gegensatz zu einer Erniedrigung der Ca^{2+} Konzentration des nicht-sauren Ca^{2+} Pool eine Reduktion der Insulinfreisetzung in INS 1 Zellen zur Folge hatte. Außerdem wurde in dieser Publikation beschrieben, daß im Gegensatz zu einer hohen intragranulären Ca^{2+} Konzentration kein niedriger intragranulärer pH für eine optimale Insulinfreisetzung erforderlich ist. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu vielen anderen Publikationen (Orci et al., 1994; Barg et al., 1999; Furukawa et al., 1999), wird aber auch von anderen bestätigt (Aspinwall et al., 2000; Aspinwall et al., 1997). Grundsätzlich scheint aufgrund dieser gegensätzlichen Beobachtungen die tatsächliche Bedeutung des intragranulären pH Wertes bezüglich des Ausmaßes der Insulinfreisetzung noch nicht klar zu sein.

Synaptotagmine sind wichtige Fusionsproteine mit Lokalisation in der Granulamembran (Mizuta et al., 1997). Inwieweit Imidazoline ihre Wirkung über Synaptotagmine vermitteln ist unklar, aber es ist bekannt, daß Synaptotagmine Wirkungen von erhöhten Ca^{2+} Konzentrationen weitervermitteln und verstärken können (Gut et al., 2001). Eine zusätzliche, modulierende Imidazolinwirkung an Synaptotagminen ist nicht ausgeschlossen.

Als weiteres granulamembranständiges Protein mit stimulierender Wirkung auf die Insulinfreisetzung ist ein von Konrad et al. 1995 beschriebenes PTX sensitives heterotrimeres G_i Protein zu nennen. Eine darüber vermittelte Imidazolinwirkung ist allerdings unwahrscheinlich, weil die zusammen mit PTX getesteten Naphthol- und Indolimidazoline in MIN 6 Zellen keinen Wirkverlust zeigten.

4.4. Untersuchungen zur Bindungskinetik von BL 11778

Lundquist et al. beschrieben 1985 für das Antimalariamittel Quinacrin, einem Acridinderivat, in Beta-Zellen eine Colokalisation mit Insulingranula. Die Ausschüttung von Insulin hatte eine Verminderung der Fluoreszenzintensität von Quinacrin zur Folge. Dies war auf eine Ausschleusung der Substanz zusammen mit Insulin zurückzuführen (Ozawa et al., 1997).

Um die Möglichkeit einer Imidazolinanreicherung innerhalb der Insulingranula ohne feste Bindung der Substanz an die Granulamembran bzw. dort verankerte Proteine auszuschließen, wurde das fluoreszierende Imidazolin BL 11778 untersucht. Dabei zeigte ein modifizierter Insulinfreisetzungsversuch mit suspendierten MIN 6 Zellen keine signifikante Fluoreszenzabnahme der mit BL 11778 und 25 mM Glukose behandelten Zellen im Vergleich zu mit BL 11778 und 0 mM Glukose behandelten Zellen. Die Imidazolinverbindung wurde demnach bei Glukosestimulation nicht zusammen mit dem Insulin der Insulingranula in den Extrazellulärraum freigesetzt, sondern verblieb aufgrund von Bindungen von BL 11778 an die Granulamembran bzw. dort verankerte Proteine in den MIN 6 Zellen. Durch die Fusion der Insulingranula mit der Plasmamembran wird die Substanz vermutlich zunächst in der Plasmamembran angereichert, um sich im weiteren Verlauf des Zellstoffwechsels zusammen mit dem vormaligen Granulamembranabschnitt wieder aus der Plasmamembran herauszulösen und in das Endoplasmatische Retikulum zu wandern. Dort wird Proinsulin in wiedergebilde Granula aufgenommen und nach Konversion der Insulinvorstufe stehen der Zelle wieder exozytierbare, gereifte Insulingranula zur Verfügung. Mit dem fluoreszenzmarkierten Sulfonylharnstoff Glibenclamid-TR/-FL konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Anfärbung granulärer Strukturen gezeigt werden. Dabei wurde auch wie bei der Imidazolinanfärbung eine polare granuläre Verteilung innerhalb der MIN 6 Zellen beobachtet. Interessanterweise haben Sulphonylharnstoffe wie Glibenclamid und Tolbutamid als schwache Säuren pKs Werte von ~5,3 wohingegen die Imidazoline als Basen pKs Werte von ~9 bis 10 aufweisen. Im Zytosol bei einem pH Wert von ~7,3 sind die beiden Substanzgruppen demnach entgegengesetzt geladen. Die Sulphonylharnstoffe liegen als deprotonierte Säuren anionisch vor, wohingegen die Imidazoline als protonierte Basen kationisch

vorliegen. Eine Anreicherung beider Substanzgruppen in den sauren (pH 4-6) Insulingranula erscheint unwahrscheinlich, da bei den Imidazolinen bereits im Zytosol eine nahezu quantitative Protonierung zum Kation eintritt und die Löslichkeit der Sulphonylharnstoffe bei Bildung der undissoziierten, ungeladenen Säure in den Granula stark abnimmt. Außerdem sind ungeladene Sulphonylharnstoffe gut membrangängig und würden auch aus diesem Grund nicht in den Insulingranula angereichert. Klassische Lysosomenfarbstoffe sind meist schwach basische Amine und detektieren die sauren Organellen durch ihre geringe Basizität mit pKs Werten von ~4 bis ~6 nach Protonierung und Kationbildung sowie Anreicherung in den sauren Kompartimenten, die Ionenfallencharakter besitzen. Wie bereits oben erwähnt sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Imidazoline stark basisch und detektieren die Granula nicht durch eine Akkumulation wie die Lysosomenindikatoren.

Insulinfreisetzende Wirkungen der Imidazolinverbindung Efaroxan wurden von Chan et al. 2001 beschrieben. Dabei wurde unter anderem bei Insulinfreisetzungsversuchen mit perifundierten Ratteninseln die Notwendigkeit der Anwesenheit des Imidazolins im Durchflußmedium für eine Steigerung der Insulinfreisetzung beschrieben. Die Entfernung von Efaroxan aus dem Durchflußmedium hatte eine schnelle und kontinuierliche Verminderung der Insulinfreisetzung bis auf basale Werte zur Folge. Die Ergebnisse der Insulinfreisetzungsversuche der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, daß bei statischen Inkubationen mit den Naphthol- und Indolimidazolinen eine Versuchsmodifikation mit Imidazolinpräinkubation und nachfolgendem Waschen keine signifikante Wirkeindebuße bewirkte. Lediglich die Dauer der Präinkubation mußte bei BL 11282 im Vergleich zu den anderen Imidazolinen von 1 auf 20 Minuten erhöht werden, um eine ähnliche Insulinfreisetzung wie beim Versuch unter Standardbedingungen zu erhalten. Inkubationen von suspendierten MIN 6 Zellen mit dem fluoreszierenden Naphtholimidazolin BL 11778 haben in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß eine Verlängerung der Imidazolininkubationszeit von 5 auf 20 und 60 Minuten zu keiner signifikanten Erhöhung der Fluoreszenzintensität bzw. ImidazolinKonzentration in den Zellen führte. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den o.g. Beobachtungen mit Efaroxan, bei denen die Autoren eine feste, auch nach ImidazolinEntfernung aus dem Medium verbleibende Imidazolinbindung an das wirkungsvermittelnde Protein wegen des Wirkverlustes

ausschlossen. Ergänzend muß zu der Publikation von Chan et al. allerdings auf die nach Entfernung von Efaroxan aus dem Perifusionsmedium wiederkehrende Efaroxanwirkung hingewiesen werden, die nach einer Erhöhung der Glukosekonzentration im Perifusionsmedium beobachtet wurde. Aus diesen Befunden kann man deuten, daß Efaroxan und vermutlich auch die Naphthol- und Indolimidazoline eine primende Wirkung vermitteln, die auch nach Substanzenentfernung zu einer erhöhten Insulinfreisetzung führen kann, und daß die Naphthol- und Indolimidazoline nach einmaligem Zellkontakt an ihrem Wirkort auch nach Entfernung aus dem Zellmedium fest binden und dort eine niedrige Dissoziationskonstante haben.

4.5. Beeinflussung der cAMP-Spiegel durch Imidazoline

Die Bedeutung von cAMP für die Insulinfreisetzung wurde vielfach beschrieben (Mariot et al., 1998). Für die Imidazoline RX 871024 und Efaroxan wurde beschrieben, daß neben ihrer depolarisationsunabhängigen Wirkung keine Beeinflussung der zytosolischen cAMP Konzentration stattfand (Zaitsev et al., 1996; Chan et al., 2001).

Die Messungen der Phosphodiesteraseinhibition sowie die Messungen der Luciferasebildung lassen beide Rückschlüsse auf cAMP- Konzentrationsänderungen zu. In der vorliegenden Arbeit wurden dadurch keine signifikanten cAMP-Spiegel erhöhenden Wirkungen der Naphthol- und Indolimidazoline festgestellt. Dies deckt sich mit o.g. Erkenntnissen über RX 871024 und Efaroxan. Außerdem konnte durch die Publikation von Chan et al. 2001 auch gezeigt werden, daß die Applikation des Imidazolinantagonisten KU14R zu einer Reduktion der durch Forskolin und IBMX vermittelten Insulinfreisetzung führte ohne dabei die durch Forskolin und IBMX vermittelte cAMP-Spiegelerhöhung zu beeinflussen. Dies deutet auf eine Wirkung des Imidazolins Efaroxan zu einem späteren Zeitpunkt in der Signalkette als die Wirkung von cAMP hin. cAMP aktiviert als second messenger die Protein Kinase A (=PKA), die durch Phosphorylierung anderer Proteine zu einer Erhöhung der Insulingranulabewegung und letztlich zu einer Erhöhung der Insulinfreisetzung führt.

Die Aktivität der Protein Kinase C (=PKC) ist von Ca^{2+} und Diacylglycerol (=DAG) abhängig. Für die Imidazolinverbindung RX 871024 wurde von Efanov, Zaitsev, Berggren et al. 2001 eine DAG- konzentrationserhöhende Wirkung in Beta-Zellen nachgewiesen. Da BL 11778 eine signifikant additive insulinfreisetzende Wirkung zu dem PKC aktivierenden Phorbolster PMA zeigte (siehe 3.1.1.) erscheint eine DAG Konzentrationserhöhung als entscheidender Teil der Imidazolinwirkungen hinsichtlich Insulinfreisetzung jedoch unwahrscheinlich.

4.6. Untersuchungen zur Toxizität der Imidazoline

Vielfach wurden bei den Insulinfreisetzungsversuchen mit Imidazolinen Konzentrations-Wirkungskurven mit einer Glockenform (=Bell shape) erhalten, was auf evtl. toxische Effekte der Substanzen bei hohen Konzentrationen hindeutete. Im Zusammenhang mit Imidazolinwirkungen in Beta-Zellen wurde von Mourtada et al. 2000 berichtet, daß bestimmte Imidazoline in hohen Konzentrationen zytotoxische Wirkungen zeigen. Dabei wurden u.a. Idazoxan und Phentolamin als Imidazoline mit antiproliferativer und zytotoxischer Wirkung identifiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den Naphthol- und Indolimidazolinen Phentolamin und Idazoxan mit dem MTS Test auf Zellproliferation und Zytotoxizität geprüft. Dabei zeigten alle getesteten Verbindungen in den jeweils applizierten Höchstkonzentrationen eine antiproliferative und zytotoxische Wirkung. Trypanblaufärbungen bestätigten dabei die Ergebnisse des MTS Tests. In allen Fällen hatte die toxische Imidazolinwirkung ein Ablösen der Zellen vom Boden zur Folge. Die Ausprägung der antiproliferativen und toxischen Wirkungen sowie das Ablösen der Zellen war bei Naphthol- und Indolimidazolinen sowie bei Phentolamin und Idazoxan sehr ähnlich. Es erscheint daher zunächst wahrscheinlich, daß die Substanzen hinsichtlich dieser Wirkungen den gleichen Wirkmechanismus haben. Mourtada et al. diskutierten die Imidazolinbindungsstellen I_2 und I_3 als mögliche, die toxischen Wirkungen vermittelnden Bindungsorte. Da Efaroxan als depolarisierendes Imidazolin ein wahrscheinlicher I_3 Agonist ist, jedoch keine antiproliferative und zytotoxische Wirkungen zeigte, kann die I_3 Bindung als wirkungsvermittelnder

Bindungsort ausgeschlossen werden. Außerdem bindet Idazoxan nicht an die I₃ Bindungsstelle. Die Imidazolinbindungsstelle I₂ scheidet ebenfalls aus, da Tolazolin als potenter I₂ Ligand im Gegensatz zum ebenfalls als I₂ Ligand bekannten Idazoxan keine antiproliferativen und zytotoxischen Wirkungen zeigte. Neben den Imidazolinbindungsstellen wurden auch alpha 2 Rezeptoren und deren Blockade als mögliche Wirkung in Betracht gezogen. Da Efaroxan auch eine alpha-2 blockierende Wirkung hat, jedoch wie oben angesprochen keine antiproliferative und zytotoxische Wirkungen zeigte, konnten alpha-2 Rezeptoren aber auch als Target ausgeschlossen werden. Diese Erkenntnisse zeigen zusammen einmal mehr, daß die Imidazolinwirkungen-sowohl die insulinfreisetzenden als auch die antiproliferativen und zytotoxischen Wirkungen- nicht durchweg über den gleichen Mechanismus vermittelt werden, sondern daß ein komplexes, z.T. heterogenes Wirkprofil dieser Substanzen vorliegt.

5. Zusammenfassung

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

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

5. Summary

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

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

6. Literaturverzeichnis

Abel KB, Lehr S, Ullrich S

Adrenaline-, not somatostatin-induced hyperpolarization is accompanied by a sustained inhibition of insulin secretion in INS-1 cells. Activation of sulphonylurea K⁺ATP channels is not involved.

Pflugers Arch 1996 May;432(1):89-96

Aizawa T, Komatsu M, Asanuma N, Sato Y, Sharp GW

Glucose action 'beyond ionic events' in the pancreatic beta cell.

Trends Pharmacol Sci 1998 Dec;19(12):496-9

Aizawa T, Kaneko T, Yajima H, Yamada S, Sato Y, Kanda Y, Kanda S, Noda M, Kadowaki T, Nagai M, Yamauchi K, Komatsu M, Hashizume K

Rapid oscillation of insulin release by the rat pancreatic islets under stringent Ca²⁺-free conditions.

J Endocrinol 2000 Sep;166(3):545-51

Asada N, Shibuya I, Iwanaga T, Niwa K, Kanno T

Identification of alpha- and beta-cells in intact isolated islets of Langerhans by their characteristic cytoplasmic Ca²⁺ concentration dynamics and immunocytochemical staining.

Diabetes 1998 May;47(5):751-7

Ashcroft FM

Ion channels and disease.

Academic Press, London, U.K. 2000; 135pp

Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB

Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, 1992, 130, 167-178.

Aspinwall CA, Brooks SA, Kennedy RT, Lakey JR

Effects of intravesicular H⁺ and extracellular H⁺ and Zn²⁺ on insulin secretion in pancreatic beta cells.

J Biol Chem 1997 Dec 12;272(50):31308-14

Aspinwall CA, Qian WJ, Roper MG, Kulkarni RN, Kahn CR, Kennedy RT

Roles of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, and release of intracellular Ca²⁺ stores in insulin-stimulated insulin secretion in beta -cells.

J Biol Chem 2000 Jul 21;275(29):22331-8

Atlas D, Burstein Y

Isolation of an endogenous clonidine-displacing substance from rat brain.

FEBS.Lett. 1984, (170): 387-390

Ball AJ, Flatt PR, McClenaghan NH

Desensitization of sulphonylurea- and nutrient-induced insulin secretion following prolonged treatment with glibenclamide.

Eur J Pharmacol 2000 Nov 24;408(3):327-33

Barg S, Renstrom E, Berggren PO, Bertorello A, Bokvist K, Braun M, Eliasson L, Holmes WE, Kohler M, Rorsman P, Thevenod F

The stimulatory action of tolbutamide on Ca²⁺-dependent exocytosis in pancreatic beta cells is mediated by a 65-kDa mdr-like P-glycoprotein.

Proc Natl Acad Sci U S A 1999 May 11;96(10):5539-44

Bousquet P

Imidazoline receptors: from basic concepts to recent developments.

J Cardiovasc Pharmacol 1995;26 Suppl 2:S1-6

Bousquet P, Feldman J, Schwartz J

Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines.

J Pharmacol Exp Ther 1984 Jul;230(1):232-6

Brasili L

Enigmatic receptors.

Pharm Acta Helv 2000 Mar;74(2-3):201-3

Brown H, Meister B, Deeney J, Corkey BE, Yang SN, Larsson O, Rhodes CJ, Seino S, Berggren PO, Fried G

Synaptotagmin III isoform is compartmentalized in pancreatic beta-cells and has a functional role in exocytosis.

Diabetes 2000 Mar;49(3):383-91

Brown CA, Chan SL, Stillings MR, Smith SA, Morgan NG

Antagonism of the stimulatory effects of efaroxan and glibenclamide in rat pancreatic islets by the imidazoline, RX801080.

Br J Pharmacol 1993 Nov;110(3):1017-22

Chan SL

Clonidine-displacing substance and its putative role in control of insulin secretion: a minireview.

Gen Pharmacol 1998 Oct;31(4):525-9

Chan SL, Dunne MJ, Stillings MR, Morgan NG

The alpha 2-adrenoceptor antagonist efaroxan modulates K⁺ATP channels in insulin-secreting cells.

Eur J Pharmacol 1991 Oct 29;204(1):41-8

Chan SL, Atlas D, James RF, Morgan NG

The effect of the putative endogenous imidazoline receptor ligand, clonidine-displacing substance, on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans.

Br J Pharmacol 1997 Mar;120(5):926-32

Chan SL, Mourtada M, Morgan NG

Characterization of a KATP channel-independent pathway involved in potentiation of insulin secretion by efaroxan.

Diabetes 2001 Feb;50(2):340-7

Chapman JC, McClenaghan NH, Cosgrove KE, Hashmi MN, Shepherd RM, Giesberts AN, White SJ, Ammala C, Flatt PR, Dunne MJ

ATP-sensitive potassium channels and efaroxan-induced insulin release in the electrofusion-derived BRIN-BD11 beta-cell line.

Diabetes 1999 Dec;48(12):2349-57

Chick WL, Warren S, Chute RN, Like AA, Lauris V, Kitchen KC

A transplantable insulinoma in the rat.

Proc Natl Acad Sci USA, 1977, 74(2), 628-632.

Clement JP 4th, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J.

Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits.

Neuron 1997 May;18(5):827-38

Cook DL, Satin LS, Ashford ML, Hales CN

ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. Spare-channel hypothesis.

Diabetes 1988 May;37(5):495-8

Daniel S, Noda M, Straub SG, Sharp GW

Identification of the docked granule pool responsible for the first phase of glucose-stimulated insulin secretion.

Diabetes 1999 Sep;48(9):1686-90

Dickinson K, North TJ, Sills S, Anthony DM, Lock JI, Vowles DT, Jones RB

BTS 67 582 stimulates insulin secretion from perfused rat pancreatic islets.

Eur J Pharmacol 1997 Nov 19;339(1):69-76

Dorschner H, Brekardin E, Uhde I, Schwanstecher C, Schwanstecher M.

Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. Mol

Pharmacol 1999 Jun;55(6):1060-6

Easom RA

CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis.

Diabetes 1999 Apr;48(4):675-84

Efanov AM, Zaitsev SV, Efanova IB, Zhu S, Ostenson CG, Berggren PO, Efendic S

Signaling and sites of interaction for RX-871024 and sulfonylurea in the stimulation of insulin release.

Am J Physiol 1998 Apr;274(4 Pt 1):E751-7

Efanov AM, Hoy M, Branstrom R, Zaitsev SV, Magnuson MA, Efendic S, Gromada J, Berggren PO

The Imidazoline RX871024 Stimulates Insulin Secretion in Pancreatic beta-Cells from Mice Deficient in K(ATP) Channel Function.

Biochem Biophys Res Commun 2001 Jun 22;284(4):918-22

Efanov AM, Zaitsev SV, Berggren PO, Mest HJ, Efendic S

Imidazoline RX871024 raises diacylglycerol levels in rat pancreatic islets.

Biochem Biophys Res Commun 2001 Mar 16;281(5):1070-3

Efanov AM, Zaitsev SV, Mest HJ, Raap A, Appelskog IB, Larsson O, Berggren PO, Efendic S

The novel imidazoline compound BL11282 potentiates glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells in the absence of modulation of K(ATP) channel activity.

Diabetes 2001 Apr;50(4):797-802

Efanova IB, Zaitsev SV, Brown G, Berggren PO, Efendic S

RX871024 induces Ca²⁺ mobilization from thapsigargin-sensitive stores in mouse pancreatic beta-cells.

Diabetes 1998 Feb;47(2):211-8

Eliasson L, Renstrom E, Ding WG, Proks P, Rorsman P

Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes Ca²⁺-induced exocytosis in mouse pancreatic B-cells.

J Physiol 1997 Sep 1;503 (Pt 2):399-412

Ernsberger P, Meeley MP, Mann JJ, Reis DJ

Clonidine binds to imidazole binding sites as well as alpha 2-adrenoceptors in the ventrolateral medulla.

Eur J Pharmacol 1987 Jan 28;134(1):1-13

French N

Alpha 2-adrenoceptors and I2 sites in the mammalian central nervous system.

Pharmacol Ther 1995;68(2):175-208

Fuhlendorff J, Rorsman P, Kofod H, Brand CL, Rolin B, MacKay P, Shymko R, Carr RD

Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes.

Diabetes 1998 Mar;47(3):345-51

Furukawa H, Carroll RJ, Swift HH, Steiner DF

Long-term elevation of free fatty acids leads to delayed processing of proinsulin and prohormone convertases 2 and 3 in the pancreatic beta-cell line MIN6.

Diabetes 1999 Jul;48(7):1395-401

Gao Z, Reavey-Cantwell J, Young RA, Jegier P, Wolf BA

Synaptotagmin III/VII isoforms mediate Ca²⁺-induced insulin secretion in pancreatic islet beta -cells.

J Biol Chem 2000 Nov 17;275(46):36079-85

Gilon P, Arredouani A, Gailly P, Gromada J, Henquin JC

Uptake and release of Ca²⁺ by the endoplasmic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic Ca²⁺ concentration triggered by Ca²⁺ influx in the electrically excitable pancreatic B-cell.

J Biol Chem 1999 Jul 16;274(29):20197-205

Gribble FM, Proks P, Corkey BE, Ashcroft FM

Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA.
J Biol Chem 1998 Oct 9;273(41):26383-7

Gromada J, Hoy M, Renstrom E, Bokvist K, Eliasson L, Gopel S, Rorsman P

CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells.

J Physiol 1999 Aug 1;518 (Pt 3):745-59

Hirose H, Seto Y, Maruyama H, Dan K, Nakamura K, Saruta T

Effects of alpha 2-adrenergic agonism, imidazolines, and G-protein on insulin secretion in beta cells.

Metabolism 1997 Oct;46(10):1146-9

Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB

Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion.

Diabetes 2000 Mar;49(3):424-30

Hoy M, Bokvist K, Xiao-Gang W, Hansen J, Juhl K, Berggren PO, Buschard K, Gromada J:

Phentolamine inhibits exocytosis of glucagon by G_{i2} protein-dependent activation of Calcineurin in rat pancreatic A-cells. J Biol Chem 276:924-30, 2001

Hoy M, Hervor LO, Bokvist K, Buschard K, Barg S, Rorsman P, Gromada J:

Tolbutamide stimulates exocytosis of glucagon by inhibition of a mitochondrial-like ATP-sensitive K⁺(K_{ATP}) conductance in rat pancreatic A-cells. J Physiol 527.1:109-120, 2000

Iino S, Sudo T, Niwa T, Fukasawa T, Hidaka H, Niki I

Annexin XI may be involved in Ca²⁺ - or GTP-gammaS-induced insulin secretion in the pancreatic beta-cell.

FEBS Lett 2000 Aug 11;479(1-2):46-50

Inagaki N, Gonoi T, Seino S

Subunit stoichiometry of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel.

FEBS Lett 1997 Jun 9;409(2):232-6

Jijakli H, Malaisse WJ

Glucose-induced mobilisation of intracellular Ca²⁺ in depolarised pancreatic islets.

J Physiol Paris 1998 Feb;92(1):31-5

Jones PM, Persaud SJ

Ca(2+)-induced loss of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity in pancreatic beta-cells.

Am J Physiol 1998 Apr;274(4 Pt 1):E708-15

Kampermann J, Herbst M, Ullrich S

Effects of adrenaline and tolbutamide on insulin secretion in INS-1 cells under voltage control.

Cell Physiol Biochem 2000;10(1-2):81-90

Kim BJ, Kim YH, Kim S, Kim JW, Koh JY, Oh SH, Lee MK, Kim KW, Lee MS

Zinc as a paracrine effector in pancreatic islet cell death.

Diabetes 2000 Mar;49(3):367-72

Komatsu M, Yajima H, Yamada S, Kaneko T, Sato Y, Yamauchi K, Hashizume K, Aizawa T

Augmentation of Ca²⁺-stimulated insulin release by glucose and long-chain fatty acids in rat pancreatic islets: free fatty acids mimic ATP-sensitive K⁺ channel-independent insulinotropic action of glucose.

Diabetes 1999 Aug;48(8):1543-9

Konrad RJ, Young RA, Record RD, Smith RM, Butkerait P, Manning D, Jarett L, Wolf BA

The heterotrimeric G-protein G_i is localized to the insulin secretory granules of beta-cells and is involved in insulin exocytosis.

J Biol Chem 1995 May 26;270(21):12869-76

Krueger KA, Ings EI, Brun AM, Landt M, Easom RA

Site-specific phosphorylation of synapsin I by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in pancreatic betaTC3 cells: synapsin I is not associated with insulin secretory granules.

Diabetes 1999 Mar;48(3):499-506

Lang J, Nishimoto I, Okamoto T, Regazzi R, Kiraly C, Weller U, Wollheim CB

Direct control of exocytosis by receptor-mediated activation of the heterotrimeric GTPases G_i and G_o or by the expression of their active G alpha subunits.

EMBO J 1995 Aug 1;14(15):3635-44

Lang J, Fukuda M, Zhang H, Mikoshiba K, Wollheim CB

The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta-cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium.

EMBO J 1997 Oct 1;16(19):5837-46

Lang J, Ushkaryov Y, Grasso A, Wollheim CB

Ca²⁺-independent insulin exocytosis induced by alpha-latrotoxin requires latrophilin, a G protein-coupled receptor.

EMBO J 1998 Feb 2;17(3):648-57

Le Brigand L, Virsolvy A, Peyrollier K, Manechez D, Godfroid JJ, Guardiola-Lemaitre B, Bataille D

Stimulation of insulin release from the MIN6 cell line by a new imidazoline compound, S-21663: evidence for the existence of a novel imidazoline site in beta cells.

Br J Pharmacol 1997 Oct;122(4):786-91

Le Brigand L, Virsolvy A, Manechez D, Godfroid JJ, Guardiola-Lemaitre B, Gribble FM, Ashcroft FM, Bataille D

In vitro mechanism of action on insulin release of S-22068, a new putative antidiabetic compound.

Br J Pharmacol 1999 Nov;128(5):1021-6

Lee K, Groh WJ, Blair TA, Maylie JG, Adelman JP

Imidazoline compounds inhibit KATP channels in guinea pig ventricular myocytes.

Eur J Pharmacol 1995 Oct 24;285(3):309-12

Lundquist I, Ahren B, Hakanson R, Sundler F

Quinacrine accumulation in pancreatic islet cells of rat and mouse: relationship to functional activity and effects on basal and stimulated insulin secretion.

Diabetologia 1985 Mar;28(3):161-6

Mariot P, Gilon P, Nenquin M, Henquin JC

Tolbutamide and diazoxide influence insulin secretion by changing the concentration but not the action of cytoplasmic Ca²⁺ in beta-cells.

Diabetes 1998 Mar;47(3):365-73

Matsumoto K, Ebihara K, Yamamoto H, Tabuchi H, Fukunaga K, Yasunami M, Ohkubo H, Shichiri M, Miyamoto E

Cloning from insulinoma cells of synapsin I associated with insulin secretory granules.

J Biol Chem 1999 Jan 22;274(4):2053-9

Mattsson JP, Vaananen K, Wallmark B, Lorentzon P

Omeprazole and bafilomycin, two proton pump inhibitors: differentiation of their effects on gastric, kidney and bone H(+)-translocating ATPases.

Biochim Biophys Acta 1991 Jun 18;1065(2):261-8

McClenaghan NH, Ball AJ, Flatt PR

Specific desensitization of sulfonylurea- but not imidazoline-induced insulin release after prolonged tolbutamide exposure.

Biochem Pharmacol 2001 Mar 1;61(5):527-36

Mears D, Leighton X, Atwater I, Rojas E

Tetracaine stimulates insulin secretion from the pancreatic beta-cell by release of intracellular calcium.

Cell Calcium 1999 Jan;25(1):59-68

Meeley MP, Hensley ML, Ernsberger P, Felsen D, Reis DJ

Evidence for a bioactive clonidine-displacing substance in peripheral tissues and serum.

Biochem Pharmacol 1992 Aug 18;44(4):733-40

Mest HJ, Raap A, Schloos J, Treinies I, Paal M, Giese U, Koivisto V

Glucose-induced insulin secretion is potentiated by a new imidazoline compound.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2001, 364:47-52

Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Oka Y, Yamagura K

Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms.

Endocrinology, 1990, 127, 126-132

Mizuta M, Kurose T, Miki T, Shoji-Kasai Y, Takahashi M, Seino S, Matsukura S

Localization and functional role of synaptotagmin III in insulin secretory vesicles in pancreatic beta-cells.

Diabetes 1997 Dec;46(12):2002-6

Mohlig M, Wolter S, Mayer P, Lang J, Osterhoff M, Horn PA, Schatz H, Pfeiffer A

Insulinoma cells contain an isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II delta associated with insulin secretion vesicles.

Endocrinology 1997 Jun;138(6):2577-84

Molderings GJ, Bonisch H, Bruss M, Likungu J, Gothert M

Species-specific pharmacological properties of human alpha(2A)-adrenoceptors.

Hypertension 2000 Sep;36(3):405-10

Molderings GJ

Imidazoline receptors: basic knowledge, recent advances and future prospects for therapy and diagnosis.

Drugs of the future 1997, 22(7):757-772

Morgan NG, Chan SL, Mourtada M, Monks LK, Ramsden CA

Imidazolines and pancreatic hormone secretion.

Ann N Y Acad Sci 1999 Jun 21;881:217-28

Morgan NG, Chan SL, Brown CA, Tsoli E

Characterization of the imidazoline binding site involved in regulation of insulin secretion.

Ann N Y Acad Sci 1995 Jul 12;763:361-73

Mourtada M, Elliott J, Smith SA, Morgan NG

Effects of imidazoline binding site ligands on the growth and viability of clonal pancreatic beta-cells.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2000 Feb;361(2):146-54

Mourtada M, Brown CA, Smith SA, Piercy V, Chan SL, Morgan NG

Interactions between imidazoline compounds and sulphonylureas in the regulation of insulin secretion.

Br J Pharmacol 1997 Jun;121(4):799-805

Musgrave IF, Hughes RA

Novel targets and techniques in imidazoline receptor research.

Ann N Y Acad Sci 1999 Jun 21;881:301-12

Nakagaki I, Sasaki S, Hori S, Kondo H

Ca²⁺ and electrolyte mobilization following agonist application to the pancreatic beta cell line HIT.

Pflugers Arch 2000 Oct;440(6):828-34

Niwa T, Matsukawa Y, Senda T, Nimura Y, Hidaka H, Niki I

Acetylcholine activates intracellular movement of insulin granules in pancreatic beta-cells via inositol trisphosphate-dependent [correction of triphosphate-dependent] mobilization of intracellular Ca²⁺.

Diabetes 1998 Nov;47(11):1699-706

Olmos G, Kulkarni RN, Haque M, MacDermot J.

Imidazolines stimulate release of insulin from RIN-5AH cells independently from imidazoline I1 and I2 receptors.

Eur J Pharmacol 1994 Sep 1;262(1-2):41-8

Orci L, Halban P, Perrelet A, Amherdt M, Ravazzola M, Anderson RG

pH-independent and -dependent cleavage of proinsulin in the same secretory vesicle.

J Cell Biol 1994 Sep;126(5):1149-56

Ozanne SE, Guest PC, Hutton JC, Hales CN

Intracellular localization and molecular heterogeneity of the sulphonylurea receptor in insulin-secreting cells.

Diabetologia 1995 Mar;38(3):277-82

Ozawa K, Tamura A, Ikeda K, Kawai E, Kondo T, Fukano Y, Nomura S, Ishihara Y, Masujima T

Video-microscopy for analysis of molecular dynamics in cells.

J Pharm Biomed Anal 1997 Jun;15(9-10):1483-8

Parini A, Moudanos CG, Pizzinat N, Lanier SM

The elusive family of imidazoline binding sites.

Trends Pharmacol Sci 1996 Jan;17(1):13-6

Poitout V, Olson LK, Robertson RP

Insulin-secreting cell lines: classification, characteristics and potential applications.

Diabetes Metab 1996 Feb;22(1):7-14

Pouli AE, Emmanouilidou E, Zhao C, Wasmeier C, Hutton JC, Rutter GA

Secretory-granule dynamics visualized in vivo with a phogrin-green fluorescent protein chimaera.

Biochem J 1998 Jul 1;333 (Pt 1):193-9

Pouli AE, Karagenc N, Wasmeier C, Hutton JC, Bright N, Arden S, Schofield JG, Rutter GA

A phogrin-aequorin chimaera to image free Ca²⁺ in the vicinity of secretory granules.

Biochem J 1998 Mar 15;330 (Pt 3):1399-404

Proks P, Ashcroft FM

Phentolamine block of KATP channels is mediated by Kir6.2.

Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Oct 14;94(21):11716-20

Quesada I, Nadal A, Soria B

Different effects of tolbutamide and diazoxide in alpha, beta-, and delta-cells within intact islets of Langerhans.

Diabetes 1999 Dec;48(12):2390-7

Qian WJ, Aspinwall CA, Battiste MA, Kennedy RT

Detection of secretion from single pancreatic beta-cells using extracellular fluorogenic reactions and confocal fluorescence microscopy.

Anal Chem 2000 Feb 15;72(4):711-7

Regunathan S, Reis DJ

Imidazoline receptors and their endogenous ligands.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 1996;36:511-44

Renström E, Ding WG, Bokvist K, Rorsman P

Neurotransmitter-induced inhibition of exocytosis in insulin-secreting beta cells by activation of calcineurin.

Neuron 1996 Sep;17(3):513-22

Roth HJ, Fenner H

Arzneistoffe

DAV Stuttgart 2000, 561 pp

Rustenbeck I, Leupolt L, Kowalewski R, Hasselblatt A.

Heterogeneous characteristics of imidazoline-induced insulin secretion.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1999 Mar;359(3):235-42

Rustenbeck I, Herrmann C, Ratzka P, Hasselblatt A

Imidazoline/guanidinium binding sites and their relation to inhibition of K(ATP) channels in pancreatic B-cells.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1997 Sep;356(3):410-7

Sakura H, Trapp S, Liss B, Ashcroft FM

Altered functional properties of KATP channel conferred by a novel splice variant of SUR1.

J Physiol 1999 Dec 1;521 Pt 2:337-50

Sato Y, Henquin JC

The K⁺-ATP channel-independent pathway of regulation of insulin secretion by glucose: in search of the underlying mechanism.

Diabetes 1998 Nov;47(11):1713-21

Scheenen WJ, Wollheim CB, Pozzan T, Fasolato C

Ca²⁺ depletion from granules inhibits exocytosis. A study with insulin-secreting cells.
J Biol Chem 1998 Jul 24;273(30):19002-8

Schulz A, Hasselblatt A.

Phentolamine, a deceptive tool to investigate sympathetic nervous control of insulin Release.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1988 Jun;337(6):637-43

Schulz A, Hasselblatt A.

An insulin-releasing property of imidazoline derivatives is not limited to compounds that block alpha-adrenoceptors.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1989 Sep;340(3):321-7

Shepherd RM, Hashmi MN, Kane C, Squires PE, Dunne MJ.

Elevation of cytosolic calcium by imidazolines in mouse islets of Langerhans: implications for stimulus-response coupling of insulin release.

Br J Pharmacol 1996 Nov;119(5):911-6

Shyng S, Nichols CG.

Octameric stoichiometry of the KATP channel complex.

J Gen Physiol 1997 Dec;110(6):655-64

Straub SG, James RF, Dunne MJ, Sharp GW

Glucose activates both K(ATP) channel-dependent and K(ATP) channel-independent signaling pathways in human islets.

Diabetes 1998 May;47(5):758-63

Stubbs M, Aiston S, Agius L

Subcellular localization, mobility, and kinetic activity of glucokinase in glucose-responsive insulin-secreting cells.

Diabetes 2000 Dec;49(12):2048-55

Suzuki M, Fujikura K, Kotake K, Inagaki N, Seino S, Takata K

Immuno-localization of sulphonylurea receptor 1 in rat pancreas.

Diabetologia 1999 Oct;42(10):1204-11

Szewczyk A

The intracellular potassium and chloride channels: properties, pharmacology and function (Review).

Molecular Membrane Biology, 1998, 15, 49-58

Tabuchi H, Yamamoto H, Matsumoto K, Ebihara K, Takeuchi Y, Fukunaga K, Hiraoka H, Sasaki Y, Shichiri M, Miyamoto E

Regulation of insulin secretion by overexpression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in insulinoma MIN6 cells.

Endocrinology 2000 Jul;141(7):2350-60

Takahashi N, Kadowaki T, Yazaki Y, Ellis-Davies GC, Miyashita Y, Kasai H

Post-priming actions of ATP on Ca²⁺-dependent exocytosis in pancreatic beta cells.

Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Jan 19;96(2):760-5

Thevenod F, Hildebrandt JP, Striessnig J, de Jonge HR, Schulz I

Chloride and potassium conductances of mouse pancreatic zymogen granules are inversely regulated by a approximately 80-kDa mdr1a gene product.

J Biol Chem 1996 Feb 9;271(6):3300-5

Tian YA, Johnson G, Ashcroft SJ

Sulfonylureas enhance exocytosis from pancreatic beta-cells by a mechanism that does not involve direct activation of protein kinase C.

Diabetes 1998 Nov;47(11):1722-6

Trube G, Rorsman P, Ohno-Shosaku T

Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic beta-cells.

Pflugers Arch 1986 Nov;407(5):493-9

Tsoli E, Chan SL, Morgan NG

The imidazoline I1 receptor agonist, moxonidine, inhibits insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans.

Eur J Pharmacol 1995 Sep 15;284(1-2):199-203

Tsubamoto Y, Eto K, Noda M, Daniel S, Suga S, Yamashita S, Kasai H, Wakui M, Sharp GW, Kimura S, Kadowaki T

Hexaminecobalt(III) chloride inhibits glucose-induced insulin secretion at the exocytotic process.

J Biol Chem 2001 Feb 2;276(5):2979-85

Ullrich S, Wollheim CB

Islet cyclic AMP levels are not lowered during alpha 2-adrenergic inhibition of insulin release.

J Biol Chem 1984 Apr 10;259(7):4111-5

Wasmeier C, Hutton JC

Secretagogue-dependent phosphorylation of the insulin granule membrane protein phogrin is mediated by cAMP-dependent protein kinase.

J Biol Chem 2001 May 15 [epub ahead of print]

Wheeler MB, Sheu L, Ghai M, Bouquillon A, Grondin G, Weller U, Beaudoin AR, Bennett MK, Trimble WS, Gaisano HY

Characterization of SNARE protein expression in beta cell lines and pancreatic islets.

Endocrinology 1996 Apr;137(4):1340-8

Wolffenbittel BH

Repaglinide--a new compound for the treatment of patients with type 2 diabetes.

Neth J Med 1999 Nov;55(5):229-34

Wollheim CB

Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in type II diabetes.

Diabetologia 2000 Mar;43(3):265-77

Yajima H, Komatsu M, Schermerhorn T, Aizawa T, Kaneko T, Nagai M, Sharp GW, Hashizume K

cAMP enhances insulin secretion by an action on the ATP-sensitive K⁺ channel-independent pathway of glucose signaling in rat pancreatic islets.

Diabetes 1999 May;48(5):1006-12

Yajima H, Komatsu M, Yamada S, Straub SG, Kaneko T, Sato Y, Yamauchi K, Hashizume K, Sharp GW, Aizawa T

Cerulein, an inhibitor of protein acylation, selectively attenuates nutrient stimulation of insulin release: a study in rat pancreatic islets.

Diabetes 2000 May;49(5):712-7

Yu W, Niwa T, Fukasawa T, Hidaka H, Senda T, Sasaki Y, Niki I

Synergism of protein kinase A, protein kinase C, and myosin light-chain kinase in the secretory cascade of the pancreatic beta-cell.

Diabetes 2000 Jun;49(6):945-52

Zaitsev SV, Efanov AM, Efanova IB, Larsson O, Ostenson CG, Gold G, Berggren PO, Efendic S.

Imidazoline compounds stimulate insulin release by inhibition of K(ATP) channels and interaction with the exocytotic machinery.

Diabetes 1996 Nov;45(11):1610-8

Zaitsev SV, Efanov AM, Raap A, Efanova IB, Schloos J, Steckel-Hamann B, Larsson O, Ostenson CG, Berggren PO, Mest HJ, Efendic S

Different modes of action of the imidazoline compound RX871024 in pancreatic beta-cells. Blocking of K⁺ channels, mobilization of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum, and interaction with exocytotic machinery.

Ann N Y Acad Sci 1999 Jun 21;881:241-52

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.-J. Mest danke ich sehr herzlich für das Überlassen des Themas der vorliegenden Arbeit und seine große persönliche, fachliche und organisatorische Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H. Marquardt danke ich für die fachliche Überarbeitung sowie die Doktorandentreffen mit interessanten fachlichen Diskussionen.

Bei Frau S. Wawro möchte ich mich für die große Hilfe bei der Einarbeitung im Labor und für die vielen Tennisspiele bedanken.

Herrn Dr. Gerhard Niederfellner danke ich für seine persönliche Unterstützung, viele fachliche Anregungen und für die vielen Tennisspiele.

Herrn Dr. Mark Radloff danke ich für die Einführung in molekularbiologische Arbeitstechniken.

Herrn S. Pfeiffer von der Universität Kiel danke ich für die fachliche Unterstützung bei der CLSM.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern der Abteilung Pharmakologie, der Bioanalytik, sowie den Damen vom Site Service der Lilly Forschung GmbH Hamburg für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Wiebke für ihre Liebe und Geduld.

8. Curriculum vitae

Geburtsdatum: 29.09.1972

Geburtsort: Leonberg

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildung

- 1979-1992 Mörike Grundschule Leonberg
 Johannes Kepler Gymnasium Leonberg
 Abschluß der allgemeinen Hochschulreife
- 1992-1993 Zivildienst im Zentral-OP des Kreiskrankenhaus Leonberg
- 1993-1994 Skilehrer in Klosters/Schweiz
- 1994-1996 Studium der Pharmazie an der Eberhard Karls Universität
 Tübingen
1. Staatsexamen
- 1996-1998 Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
2. Staatsexamen
- 1999 3. Staatsexamen

Berufliche Laufbahn

- 1998-1999 Praktisches Jahr 12 Monate in der privilegierten Adler-Apotheke
 In Hamburg-Wandsbek
- 2000-2001 Promotion im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

Sprachen

Englisch, Französisch

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.

Hamburg, den 15. 10. 2001

Mathis Scheltdorf