

Pharmakologie und Toxikologie

**PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS
VON ANGIOTENSIN II AUF DIE INSULINSEKRETION
AN DER INSULINOMAZELLINIE INS-1**

Jens Wensing

2008

Pharmakologie und Toxikologie

**PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS
VON ANGIOTENSIN II AUF DIE INSULINSEKRETION
AN DER INSULINOMAZELLINIE INS-1**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Jens Wensing
aus Greven
2008

Dekan:	Prof. Dr. F. Ekkehardt Hahn
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Eugen J. Verspohl
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Matthias Lehr

Tag der Disputation:	07. April 2008
Tag der Promotion:	07. April 2008

Meiner Frau und meiner Familie

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS PANKREAS	1
1.1.1	Das exokrine Pankreas	2
1.1.2	Das endokrine Pankreas	6
1.1.2.1	α -Zellen	6
1.1.2.2	δ -Zellen	7
1.1.2.3	PP-Zellen	7
1.1.2.4	ϵ -Zellen	7
1.1.2.5	β -Zellen	8
1.2	DAS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM	11
1.2.1	Rezeptoren	12
1.2.1.1	AT ₁ -Rezeptor	12
1.2.1.2	AT ₂ -Rezeptor	15
1.2.1.3	IRAP, AT ₄ -Rezeptor	16
1.2.1.4	Mas/ANG (1-7)-Rezeptor	18
1.2.2	Enzyme	20
1.2.2.1	Renin	20
1.2.2.2	ACE-1	21
1.2.2.3	ACE-2	22
1.2.2.4	Chymase	23
1.2.2.5	Bildung der Angiotensin Peptide	23
1.2.3	Peptide	26
1.2.3.1	Angiotensinogen	26
1.2.3.2	Angiotensin II	26
1.2.3.3	Angiotensin III	26
1.2.3.4	Angiotensin IV	26
1.2.3.5	Angiotensin (1-7)	27
1.3	DAS RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM DES PANKREAS	28
1.3.1	Das exokrine Pankreas	32
1.3.2	Das endokrine Pankreas	36
1.4	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	42
2	MATERIAL	43
2.1	ZELLKULTUR	43
2.1.1	Zelllinien	43
2.1.1.1	INS-1	43
2.1.1.2	3T3-L1	44
2.1.2	Chemikalien	45
2.1.3	Zellkulturmedien	45
2.1.4	Materialien	47
2.2	1D-SDS-PAGE/WESTERN BLOT	48
2.2.1	Chemikalien	48

2.2.2	Puffer und Stammlösungen	48
2.2.3	Material	51
2.3	BINDUNGSSTUDIEN	52
2.3.1	Chemikalien	52
2.3.2	Puffer und Stammlösungen	52
2.3.3	Material	52
2.4	INSULINSEKRETION	53
2.4.1	Chemikalien	53
2.4.2	Puffer und Stammlösungen	53
2.4.3	Material	54
2.5	RADIO-IMMUNO-ASSAY	55
2.5.1	Chemikalien	55
2.5.2	Puffer und Stammlösungen	55
2.5.3	Material	56
2.6	⁴⁵CALCIUMAUFNAHME	57
2.6.1	Chemikalien	57
2.6.2	Puffer und Stammlösungen	57
2.6.3	Material	57
3	METHODEN	58
3.1	1D-SDS-PAGE/WESTERN BLOT	58
3.1.1	Probengewinnung	58
3.1.2	Gelelektrophorese	59
3.1.3	Western Blot	60
3.1.4	Detektion	60
3.2	REZEPTORBINDUNGSSTUDIEN	62
3.2.1	Bindungskinetik	62
3.2.2	Verdrängungsversuche	63
3.3	INSULINSEKRETION	65
3.4	RADIOIMMUNOASSAY	66
3.4.1	Tag 1	66
3.4.2	Tag 2	67
3.5	⁴⁵CALCIUMAUFNAHME	68
3.5.1	Durchführung	68
3.5.2	Kinetik	69
4	ERGEBNISSE	70
4.1	1D-SDS-PAGE/WESTERN BLOT	70

4.2	BINDUNGSSTUDIEN	73
4.2.1	Kinetik	73
4.2.1.1	INS-1	73
4.2.1.2	3T3-L1	75
4.2.2	Verdrängungsversuche	77
4.2.2.1	INS-1	77
4.2.2.2	3T3-L1	80
4.3	INSULINSEKRETION/RADIOIMMUNOASSAY	83
4.4	⁴⁵CALCIUMAUFNABME	88
4.4.1	Kinetik	88
4.4.2	5 min	89
4.4.3	2,5 min	90
5	DISKUSSION	93
5.1	ANG II-BINDUNGSSTELLEN IM PANKREAS	93
5.1.1	Immunodetektion	93
5.1.2	Rezeptorbindungsstudien	96
5.2	BEEINFLUSSUNG DER INSULINSEKRETION DURCH ANG II	100
5.3	BEEINFLUSSUNG DER INTRAZELLULÄREN CALCIUMKONZENTRATION DURCH ANG II	105
5.4	AUSBLICK	107
6	ZUSAMMENFASSUNG	109
6.1	ERGEBNISSE	109
6.2	SCHLUSSFOLGERUNGEN	110
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	112
8	LITERATURVERZEICHNIS	114

ACh: Acetylcholin
ANG: Angiotensin
AGT: Angiotensinogen
APA: Aminopeptidase A
APB: Aminopeptidase B
APN: Aminopeptidase N
AS: Aminosäure
ATP: Adenosintriphosphat
BSA: Bovines Serumalbumin
cAMP: Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCK Cholezystokinin, Pankreozymin
CPA: Carboxypeptidase A
CPM: counts per minute
DAG: Diacylglycerol
DA: Dopamin
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO: Dimethylsulfoxid
ECL: enhanced chemoluminescence DPA III: Dipeptidylaminopeptidase III
ER: Endoplasmatisches Retikulum
ERK: extracellular-signal regulated kinase
FCS: fetal calf serum
GLP: Glucagon-like peptide
Glut: Glukosetransporter
GPCR: g-protein coupled receptor
HRP: horseradish peroxidase
IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthine
IP₃: Inositoltrisphosphat
IRAP: Insulin regulierte Aminopeptidase
IRI: Immunoreaktives Insulin
ISC: short circuit current (semiconductor device property)
JAK: Januskinase
KRH: Krebs-Ringer-HEPES
MAPK: mitogen activated protein kinase
NA: Noradrenalin

NCS: neonatal calf serum
NEP: neutrale Endopeptidase, Neprilysin
NFκB: nukleärer Faktor κB
NPY: Neuropeptid Y
NSB: nonspecific binding
OLETF: Otsuka Long-Evans Tokushima fatty
PBST: Phosphate buffered saline with Tween
PEP: Prolylendopeptidase
PKC: Proteinkinase C
PLC: Phospholipase C
PP: Pankreatisches Polypeptid
Raf: rapidly growing fibrosarcoma
RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA: Radioimmunoassay
Sarile: (Sar1;Ile8)-Angiotensin II (1-8)
SARS: severe acute respiratory syndrome
SST: Somatostatin
SSTR: Somatostatinrezeptor
STAT: signal transducer and activator of transcription
TGF: transforming growth factor
T2DM: Typ 2 Diabetes mellitus
UCP-2: Uncoupling protein-2
VIP: Vasoaktives intestinales Peptid
WBN/Kob: Wistar Bonn/Kobori
ZDF: Zucker diabetic fatty

1 Einleitung

1.1 Das Pankreas

Das Pankreas ist eine sowohl exokrine als auch endokrine Drüse. Anatomisch aufgeteilt wird das Pankreas in den Pankreaskopf, den Pankreaskörper und den Pankreasschwanz. Eine andere Unterteilungsmöglichkeit besteht in der unterschiedlichen Funktion der Zellen im Pankreas. Die Azinuszellen des exkretorischen Teils des Pankreas sind in unregelmäßige Lappen, diese wiederum in Läppchen und als kleinste Untereinheit beerenförmig als sogenannte Azini zusammengefasst, was dem Organ seine äußere Struktur verleiht. In diese Läppchen sind die innersekretorischen Zellen inselartig als sogenannte Langerhans'sche Inseln eingelagert. Zur Ableitung des exokrinen Sekrets führt durch das gesamte Organ der Ductus pancreaticus, der zusammen mit oder nahe bei dem Ductus choledochus durch die Papilla duodeni major (Papilla Vateri) in das Duodenum mündet. Neben dem Ductus pancreaticus gibt es meist noch einen weiteren Pankreasgang, den Ductus pancreaticus accessorius, welcher in der Papilla duodeni minor ins Duodenum führt.

1.1.1 Das exokrine Pankreas

Das exokrine Pankreas bildet für die Verdauung der Nahrung wichtige hydrolytische Enzyme. Diese Enzyme, oder deren Vorstufen, werden auf der apikalen Seite der Azinuszellen in Zymogengranula gespeichert. Die Produktionsmenge an alkalischem Pankreassaft oder Bauchspeichel, der neben den Enzymen auch Elektrolyte enthält, liegt beim Menschen durchschnittlich bei 2 l pro Tag.

Den Großteil der produzierten Enzyme machen die proteolytischen Enzyme (Endo- und Exopeptidasen) aus. Diese Peptidasen sowie Kolipase, einem Kofaktor der Lipasen, und Phospholipase A werden nicht als aktive Enzyme, sondern als inaktive Vorstufen sezerniert, um während der Passage durch den Pankreasgang eine Selbstverdauung des Organs zu verhindern. Aktiviert werden die Vorläuferenzyme mittels limitierter Proteolyse durch die Enteropeptidase (Enterokinase), einer Peptidase, die in der Schleimhaut des Doudenums eingelagert ist. Weitergeführt wird die Aktivierung durch, aus Trypsinogen freigesetztem, Trypsin. Damit während der Passage des Pankreassafts durch den ableitenden Ductus pancreaticus fälschlich aktiviertes Trypsin keinen Schaden anrichtet, wird gleichzeitig ein Trypsininhibitor mitsezerniert. Als direkt aktive Enzyme werden die Lipasen, die Amylasen und die Ribonucleasen sezerniert.

Die Sekretion der Verdauungsenzyme ist dabei nicht kontinuierlich, sondern an Reize, die an Nahrungsaufnahme gekoppelt sind, gebunden. In der digestiven Phase wird die Sekretion vor allem durch ACh^I und das Peptidhormon CCK^{II}, das dem Gastrin ähnelt, stimuliert. Sekretin hat an den Azinuszellen nur einen geringen Einfluss. Durch die beiden G_q-gekoppelten Rezeptoren für ACh und CCK wird über IP₃^{III} Ca²⁺ aus dem ER^{IV} freigesetzt, was an Calmodulin bindet und zu einer Exozytose führt.

^I ACh: Acetylcholin

^{II} CCK Cholezystokinin, Pankreozymin

^{III} IP₃: Inositoltrisphosphat

^{IV} ER: Endoplasmatisches Retikulum

Proenzym	Enzym	Substrat	Funktion	Spaltprodukt
Endopeptidasen				
Trypsinogen	Trypsin	Proteine Polypeptide	Spaltung von Arg- und Lys-Bindungen	Poly- und Oligopeptide
Chymotrypsinogen	Chymotrypsin	Proteine Polypeptide	Spaltung von Phe-, Tyr- und Trp-Bindungen	Poly- und Oligopeptide
Proelastase	Elastase	Proteine Elastin	Spaltung von Peptidbindungen	Poly- und Oligopeptide
Exopeptidasen				
Procarboxypeptidase A	Carboxypeptidase A	Poly- und Oligopeptide	Spaltung C-terminaler Peptidbindungen	Aminosäuren
Procarboxypeptidase B	Carboxypeptidase B	Poly- und Oligopeptide	Spaltung C-terminaler Arg- und Lys-Bindungen	Aminosäuren
Proaminopeptidasen	Aminopeptidasen	Poly- und Oligopeptide	Spaltung N-terminaler Peptidbindungen	Aminosäuren
Lipasen				
	Lipase	Triacylglycerole	Fettsäureesterspaltung in Position 1 und 3	Fettsäuren 2-Monoacylglycerole
Prophospholipase	Phospholipase	Phospholipide	Fettsäureesterspaltung in Position 2	Fettsäuren Lysolecithin
Amylasen				
	α -Amylase	Stärke Glykogen	Spaltung von 1,4- α -glykosidischen Bindungen	Oligosaccharide Maltose
	Maltase	Maltose	Spaltung von 1,4- α -glykosidischen Bindungen	Glukose
Ribonucleasen				
	Ribonuclease	RNA	Spaltung von Phosphorsäureestern	Nukleotide
	Desoxyribonuclease	DNA	Spaltung von Phosphorsäureestern	Nukleotide

Tabelle 1-1: Enzyme des Pankreassaftes mit ihren Substraten, Funktionen und Spaltprodukten

Neben den an der Verdauung beteiligten Enzymen werden vom Pankreas auch Elektrolyte sezerniert. Diese sind zwar in ihrer Gesamtmolarität immer gleich, aber in der digestiven Phase werden vermehrt Bicarbonat-Ionen sezerniert. Dadurch steigt der pH-Wert des Pankreassaftes auf 8,2. Die Veränderung des pH-Werts wird durch Sekretin aus den S-Zellen der Darmschleimhaut beeinflusst. Durch den alkalischen Pankreassaft wird der saure Speisebrei aus dem Magen neutralisiert, so dass die verdauenden Enzyme in ihrem pH-Optimum arbeiten können.

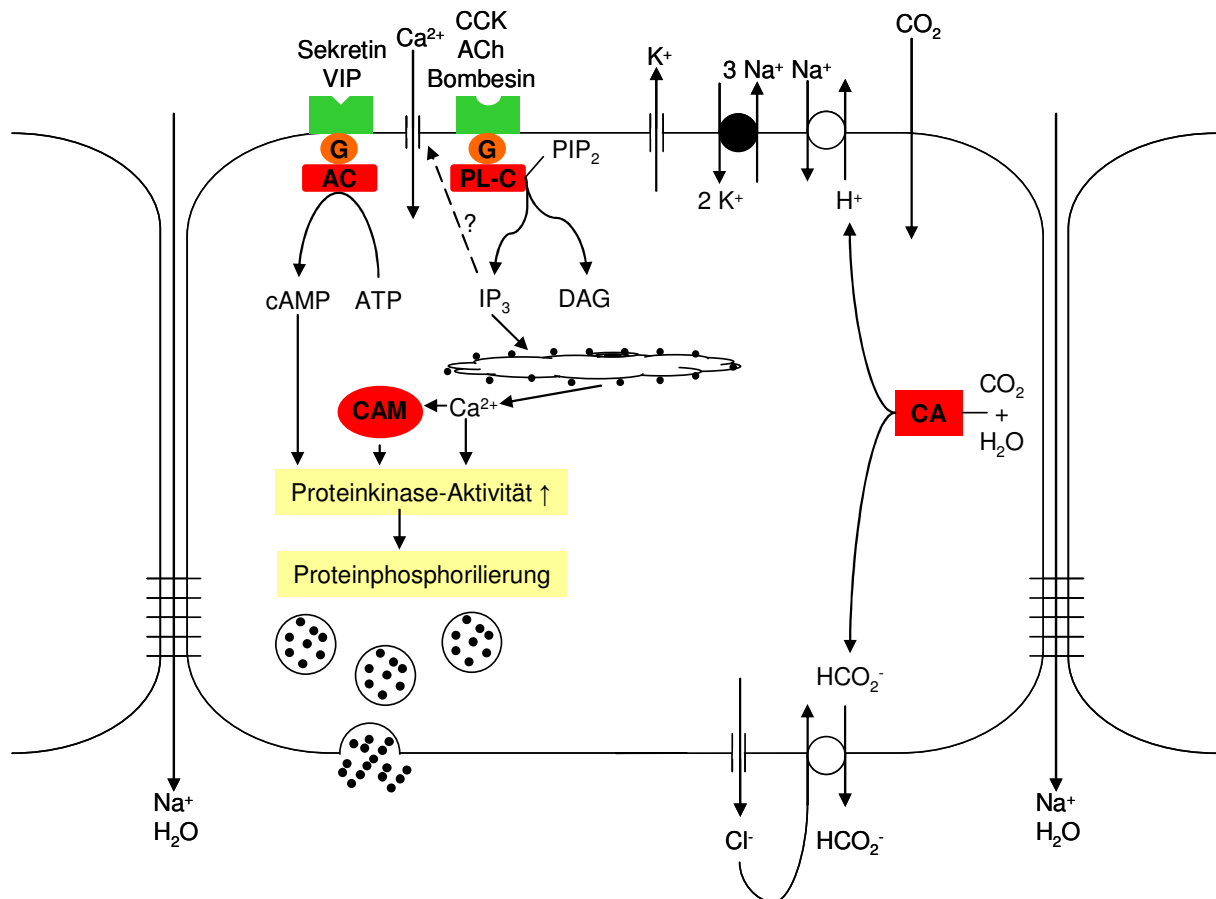


Abbildung 1-1: Stimulation-Sekretions-Kopplung und Elektrolyttransport aus der Azinuszelle in den Ausführungsgang des Pankreas.

AC: Adenylatcyclase, CA: Carboanhydratase, CAM: Calmodulin, DAG: Diacylglycerol, G: G-Protein, IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat, PLC: Phospholipase C, PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

Die Pankreassaftsekretion, die basal ca. 5 ml/h beträgt, kann nach Nahrungsaufnahme auf bis zu 8 ml/min ansteigen und bis zu 3 h anhalten. Dabei erfolgt die Aktivierung der Sekretion in drei Phasen. In der kephalen Phase wird die Sekretion durch den Geruch, den Geschmack und das Kauen der Nahrung gesteigert. Dies geschieht durch den Nervus Vagus. Dadurch werden durch postganglionäre parasympathische Nervenfasern VIP^V und Gastrin releasing Peptid (GRP) freigesetzt und die Bicarbonatsekretion gesteigert. Die vermehrte Sekretion der Verdauungsenzyme geschieht in den Azinuszellen hingegen über ACh. In der sich anschließenden gastralen Phase hat die Nahrung den Magen erreicht und es kommt zur Dehnung der Magenwand. Diese Dehnung sowie vago-vagale Reflexe und Gastrinfreisetzung führen zu einer weiteren Steigerung der

^V VIP: Vasoaktives intestinales Peptid

Pankreassaftsekretion. Sobald der Nahrungsbrei in das Doudenum übertritt, beginnt die wichtigste Aktivierungsphase, die intestinale Phase. In dieser Phase wird die Sekretion hauptsächlich über gastrointestinale Peptide, weniger über den N. Vagus gesteigert. Durch das Abfallen des pH-Wertes wird Sekretin freigesetzt, das die Sekretion von HCO_3^- -Ionen steigert. Diese Bicarbonat-Ionen können zusammen mit den HCO_3^- -Ionen aus der Galle und den Brunner-Drüsen der Darmschleimhaut den pH-Wert auf 6-8 anheben. Die Sekretion der Pankreasenzyme wird durch CCK stimuliert, das aus I-Zellen des oberen Duodenums und des Jejunums freigesetzt wird. Die Freisetzung von CCK wird durch Spaltprodukte von Fetten und Eiweißen sowie Ca^{2+} gesteigert. Kohlenhydrate haben keine Wirkung auf die Freisetzung. Wie auch schon in der gastralen Phase wird die humorale Stimulation der Pankreassaftsekretion durch vago-vagale Reflexe und Sekretin unterstützt [1].

1.1.2 Das endokrine Pankreas

Das endokrine Pankreas, welches in das exokrine Pankreas eingelagert ist, produziert Hormone, die es direkt in das Blut abgibt. Dafür sind die Langerhans'schen Inseln, die in ihrer Gesamtheit auch als Inselorgan bezeichnet werden und 1869 durch den deutschen Mediziner Paul Langerhans entdeckt wurden, mit einem dichten Netz von gefensterten (fenestrierten) Kapillaren durchzogen. Im Durchschnitt besitzt der Mensch ca. eine Million dieser Inseln, welche einen Durchmesser zwischen 0,2 und 0,5 mm haben. Bis heute sind fünf verschiedene Hormone bekannt, die im endokrinen Pankreas produziert werden. In den β -Zellen, die mit 65-80 % den Hauptanteil der Zellmasse ausmachen, wird Insulin produziert, worauf im weiteren Verlauf noch näher eingegangen wird.

1.1.2.1 α -Zellen

Den zweitgrößten Anteil des gesamten endokrinen Pankreas stellen mit 15-20 % die α -Zellen (A-Zellen) dar. Sie bilden Glucagon, das aus einer Peptidkette mit 29 AS^{VI} besteht und eine enge Strukturverwandtschaft zu VIP und Sekretin aufweist. Glucagon stellt in vielen Stoffwechselforgängen einen Gegenspieler zum Insulin dar. So wird es bei einer Hypoglykämie freigesetzt und führt an seinem Haupteffektororgan, der Leber, zu einer Steigerung der Glykogenolyse und der Glukoneogenese aus AS, was zu einem Anstieg des Harnsäurespiegels führen kann. Für die Steigerung der Glukoneogenese wirkt es im Proteinstoffwechsel katabol zur Bereitstellung von AS. Durch Aktivierung von Lipasen im Fettgewebe kommt es unter Glucagoneinwirkung zu einer vermehrten Bereitstellung von freien Fettsäuren im Blut. Auch wenn die Glucagonsekretion bei normaler Ernährung relativ konstant ist, kann sie auf das Vierfache steigen. Dies kann durch Vagusreize, Aktivierung von β -Rezeptoren, körperliche Arbeit, Stress und proteinreiche Mahlzeiten, da auch freie AS wie Arginin und Alanin die Sekretion stimulieren, geschehen. Hemmend auf die Ausschüttung von Glucagon wirken sich Hyperglykämie, α -Rezeptoragonisten, Insulin, SST^{VII} und GLP^{VIII}-1 aus.

^{VI} AS: Aminosäure

^{VII} SST: Somatostatin

^{VIII} GLP: Glucagon-like peptide

1.1.2.2 δ -Zellen

Die δ -Zellen, die ca. 3-10 % der Inselzellmasse ausmachen, bilden SST. Dieses hat im Pankreas wie ein Gewebshormon eine hemmende parakrine Wirkung sowohl auf die Insulin- als auch auf die Glucagonausschüttung. Außerdem hemmt es die Magensaftsekretion, die Darmmotilität und die Ausschüttung gastrointestinaler Hormone wie VIP, Gastrin, Sekretin, Motilin und CCK. In der Hypothalamus/Hypophysen-Achse hat SST eine Gegenspielerfunktion zum Somatoliberin.

1.1.2.3 PP-Zellen

Die PP-Zellen (F-Zellen), die nur einen kleinen Teil der Langerhans'schen Inseln ausmachen, produzieren das PP^{IX}. Dieses aus 36 AS bestehende Peptid aus der NPY^X-Familie, scheint eine dem CCK antagonistische Wirkung zu haben [2]. Es hemmt die Enzym- und Hydrogencarbonat-Produktion der Bauchspeicheldrüse, den Gallenfluss und die Motilität des Darms. Dadurch kommt es bei PP überexprimierenden Mäusen zur Ausbildung eines dünnen Phänotyps mit verringerter Nahrungsaufnahme und verlangsamter Magenentleerung [2].

1.1.2.4 ϵ -Zellen

Einen weiteren kleinen Teil der Zellen des Inselzellorgans machen ϵ -Zellen aus. Sie produzieren Ghrelin, ein aus 28 AS bestehendes Peptidhormon, das am Serin in Position 3 für die Wirkung essentiell mit Octansäure verestert ist. Ghrelin, das hauptsächlich im Epithel des Magenfundus produziert wird, ist ein endogener Ligand für den growth Hormon secretagogue receptor im Hypophysenvorderlappen und stimuliert so die Freisetzung von Wachstumshormonen.

Neben dieser Hauptwirkung reguliert Ghrelin die Magenmotilität und Säureproduktion, hat kardiovaskuläre und antiinflammatorische Wirkungen, moduliert die Zellproliferation, beeinflusst die Sekretion des exo- und endokrinen Pankreas sowie den Fett- und Glukosestoffwechsel [3]. Durch diese Wirkungen hat Ghrelin scheinbar einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Nahrungsaufnahme. Bei Hunger steigt der Ghrelinspiegel an und nach Nahrungsaufnahme sinkt er wieder ab. Auch bei dem seltenen Prader-Willi-Syndrom, das durch fehlendes Sättigungsgefühl

^{IX} PP: Pankreatische Polypeptid
^X NPY: Neuropeptid Y

charakterisiert ist, zeigen sich teilweise sehr stark erhöhte Ghrelinspiegel [4]. Außerdem gibt es eine negative Korrelation zwischen dem Ghrelinspiegel und dem Body-Mass Index (BMI) [5].

1.1.2.5 β -Zellen

Die β -Zellen, die wie schon erwähnt den Hauptteil der Inselzellmasse ausmachen, sind, wie auch die übrigen Inselzelltypen, etwas heller gefärbt als die Zellen des exokrinen Pankreas. Die β -Zellen lassen sich aber von den anderen Inselzellen mikroskopisch leicht dadurch unterscheiden, dass sie in ihren Sekretgranula kristalline Strukturen aufweisen, die dunkel gefärbt sind, wobei es sich dabei um die Speicherform des Insulins als Zinksuspension handelt.

Das Insulin, das 1921 von Banting und Best entdeckt wurde, besteht aus zwei Peptidketten, einer 21 AS langen A-Kette und einer 30 AS langen B-Kette. Diese beiden Ketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft und die A-Kette ist noch einmal durch eine Disulfidbrücke zwischen Position 6 und 11 in sich verknüpft (intra- und interchenare Verknüpfung). Insulin wird in der β -Zelle als Präproinsulin am rauen ER mit 107 AS gebildet. Hier werden auch die Disulfidbrücken für die Faltung geknüpft. Beim Ausschleusen aus dem ER wird das Signalpeptid, das in den Zisternen des ER zurückbleibt, abgespalten und das 84 AS Proinsulin tritt in den Golgi-Apparat über. Hier wird das connecting peptide, das zwischen der A- und der B-Kette liegt, herausgeschnitten und das nun zu Ende prozessierte Insulin wird als Hexamer an Zink gebunden in speziellen Granula gespeichert.

Ein physiologischer Reiz für die Insulinsekretion ist der Anstieg der Blutglukose. Durch den niederaffinen, insulinunabhängigen Glut^{XI} 2 wird Glukose in die β -Zellen aufgenommen. Hier wird die Glukose durch die hochaffine Hexokinase ($K_m = 0,01 \text{ mM}$) und die niederaffine Glukokinase, deren K_m -Wert nahe der normalen Serumkonzentration für Glukose liegt, an Position 6 phosphoryliert. Die hochaffine Hexokinase, die ubiquitär im Körper vorkommt, stellt dabei die Grundversorgung der Zellen mit Energie und der basalen Insulinsekretion sicher, wohingegen der niederaffine $\text{Glut} 2$ und die Hexokinase nur bei hohen Glukosespiegel für eine erhöhte Insulinabgabe verantwortlich sind und damit eine wichtige Aufgabe im

^{XI} Glut : Glukosetransporter

„Blutzucker-Sensorsystem“ des Pankreas erfüllen. Wird Glukose-6-Phosphat metabolisiert, steigt der intrazelluläre ATPXII-Spiegel. Dadurch werden ATP-abhängige K^+ -Kanäle geschlossen und es kommt zu einer Depolarisation der β -Zellen. Dies wiederum führt zur Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanälen und zu einem Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle. Durch das intrazellulär erhöhte Ca^{2+} kommt es dann zur Mobilisierung der Speichergranula und zu einer Ausschüttung von Insulin. Die Insulinsekretion wird hauptsächlich durch Glukose gesteuert, kann aber durch mehrere Faktoren moduliert werden. So kann durch GPCR^{XIII}s die Aktivität der Adenylylcyclase oder der PLC^{XIV} und damit die Insulinsekretion gesteigert werden. Glucagon, gastric inhibitory peptide (GIP), GLP-1 und VIP steigern über G_s -gekoppelte Rezeptoren die Aktivität der Adenylylcyclase. Dadurch steigt der intrazelluläre cAMP^{XV}-Spiegel, welcher die Proteinkinase A (PKA) stimuliert, die dann Calciumkanäle phosphoryliert. PLC kann durch ACh und CCK über einen G_q -gekoppelten Rezeptor stimuliert werden. Diese spaltet vermehrt Phosphatidylinositol-4,5-bisposphat (PIP_2) in IP_3 und DAG^{XVI}. IP_3 setzt Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern frei und DAG aktiviert PKC^{XVII}. Gehemmt wird die Insulinausschüttung durch NA^{XVIII} über den α_2 -Rezeptor, der die Adenylylcyclase hemmt, und durch NPY, PP, SST und Leptin.

^{XII} ATP: Adenosintriophosphat

^{XIII} GPCR: g-protein coupled receptor

^{XIV} PLC: Phospholipase C

^{XV} cAMP: Cyclisches Adenosinmonophosphat

^{XVI} DAG: Diacylglycerol

^{XVII} PKC: Proteinkinase C

^{XVIII} NA: Noradrenalin

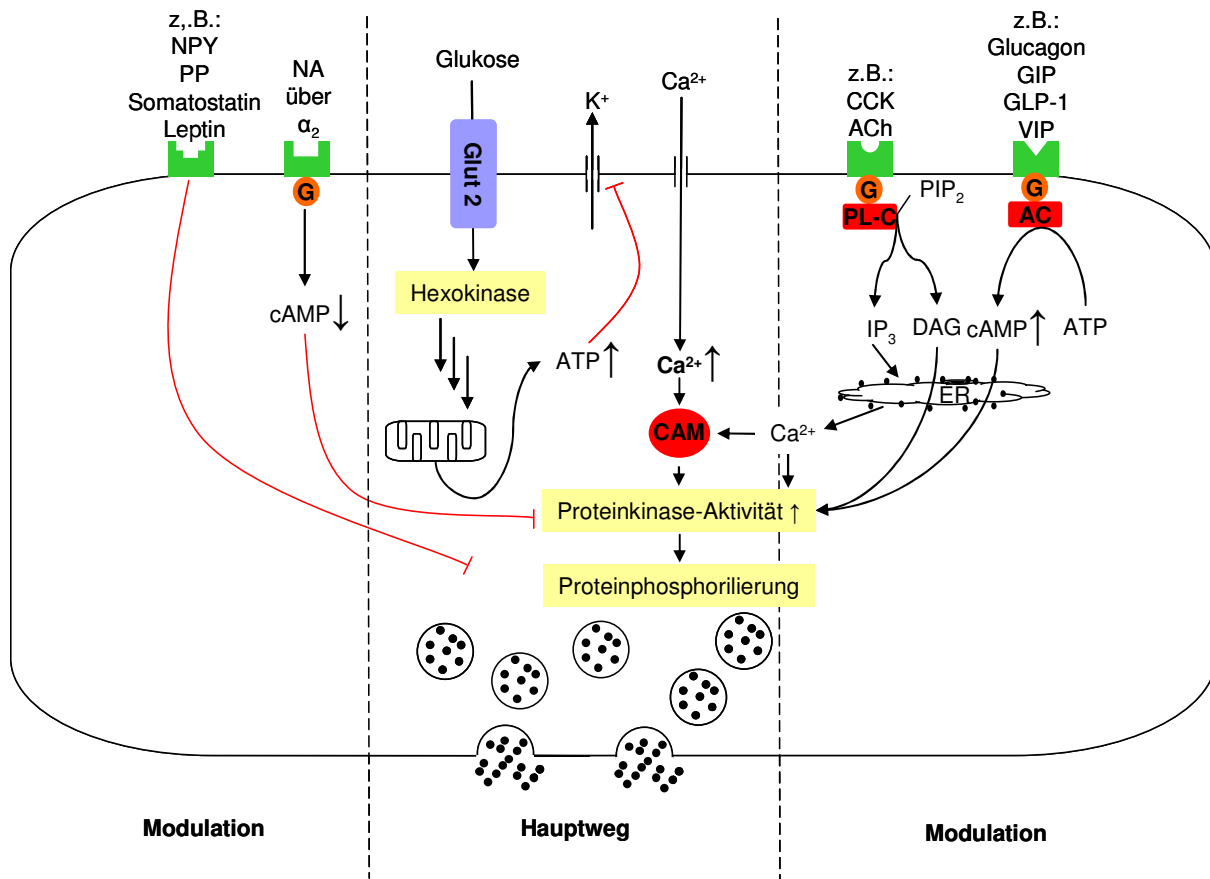


Abbildung 1-2: Signalkaskade für die Insulinsekretion und Modulationsmechanismen
 AC: Adenylylcyclase, ACh: Acetylcholin, ATP: Adenosintriphosphat, CAM: Calmodulin,
 cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, CCK: Cholezystokinin, DAG: Diacylglycerol,
 ER: Endoplasmatisches Retikulum, G: G-Protein, GIP: gastric inhibitory peptide,
 GLP-1: Glucagon-like Peptid-1, IP_3 : Inositol-1,4,5-trisphosphat, NA: Noradrenalin,
 NPY: Neuropeptid Y, PIP_3 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PLC: Phospholipase C,
 PP: Pankreatisches Polypeptid, VIP: Vasoaktives intestinales Peptid

Sezerniertes Insulin wirkt im Körper als wachstumsförderndes, anaboles Hormon. Es fördert hauptsächlich die Aufnahme von freien Fettsäuren, AS und Glukose in Myo-, Hepato- und Adipozyten, aber auch in andere Zelltypen. Nach Bindung an seinen Rezeptor erlangt dieser durch Konformationsänderung und Autophosphorylierung die Eigenschaften einer Tyrosinkinase. Über teilweise noch nicht im Einzelnen bekannte Zwischenschritte werden hochaffine GLUT 4 zur Zelloberfläche transportiert, die Phosphofruktokinase und in Myo- und Hepatozyten die Glykogensynthase aktiviert. Außerdem hat Insulin einen Protein-anabolen Effekt und führt im Fettgewebe zur Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten und zur Lipogenese in Adipozyten.

1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das klassische RAAS^{XIX} ist als Hormonsystem sehr gut untersucht. Dies gilt hauptsächlich für seine systemischen Wirkungen, weniger für seine lokalen Wirkungen. Da es zur Lang- und Kurzzeitregulation des Blutdrucks beiträgt, wurden zur Behandlung einer Hypertonie mit den ACE-Hemmern, den AT₁-Rezeptorantagonisten (Sartane) und dem seit 2007 im Markt befindlichen Renin-Inhibitor Aliskiren schon mehrere Arzneistoffgruppen, die in dieses System eingreifen, eingeführt.

Zu Beginn der RAA-Kaskade steht die Ausschüttung von Renin aus den Juxtaglomerulären Zellen der Niere. Physiologische Reize für die Freisetzung von Renin sind Hyponatriämie, Hypovolämie und ein verminderter Blutdruck im Vas afferens des Glomerulus. Außerdem wird durch verminderten peripheren Blutdruck der Sympathikus aktiviert und Adrenalin ausgeschüttet. Adrenalin kann dann über β_1 -Rezeptoren die Reninsekretion steigern.

Das freigesetzte Renin spaltet aus AGT^{XX} das inaktive ANG^{XXI} I ab. Durch ACE wird ANG I weiter zu ANG II prozessiert. Das so gebildete ANG II ist einer der stärksten Vasokonstriktoren und sogar 40-fach stärker wirksam als NA. Über AT₁-Rezeptoren steigert ANG II den Blutdruck entsprechend den aktuellen Erfordernissen. ANG II hat aber auch einen längerfristigen Effekt auf den Blutdruck, indem es im zentralen Nervensystem (ZNS) einen vermehrten Salzhunger und ein Durstgefühl induziert und zum anderen an der Hypophyse zu einer Sekretion von antidiuretischem Hormon (ADH, Vasopressin, Adiuretin) führt. Des Weiteren kommt es über AT₁-Rezeptoren an der Nebennierenrinde zur Ausschüttung des Mineralocorticoids Aldosteron. Aldosteron bindet nach seiner Freisetzung an einen intrazellulären Rezeptor in spätdistalen Tubulusabschnitten der Niere und bedingt dort eine vermehrte Expression der Na⁺/K⁺-ATPase und von Na⁺-Kanalproteinen. Dies führt zu einer vermehrten Rückresorption von Na⁺ und Wasser, wodurch wiederum der Blutdruck steigt.

^{XIX} RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

^{XX} AGT: Angiotensinogen

^{XXI} ANG: Angiotensin

1.2.1 Rezeptoren

Die klassischen, auf den Blutdruck bezogenen Effekte des RAAS werden durch den AT₁-Rezeptor vermittelt, der zu der Gruppe der Rezeptoren mit sieben transmembranären α-Helices gehört. Zusammen mit dem AT₂-Rezeptor, einem weiteren Angiotensinrezeptor, der zur selben Superfamilie gehört, sind diese beiden Rezeptoren, die am besten erforschten Angiotensinrezeptoren. Obwohl auch bezüglich des AT₂-Rezeptors noch viele Fragestellungen der Klärung bedürfen, ist über weitere Rezeptoren, die durch Angiotensinpeptide bedient werden, noch weniger bekannt.

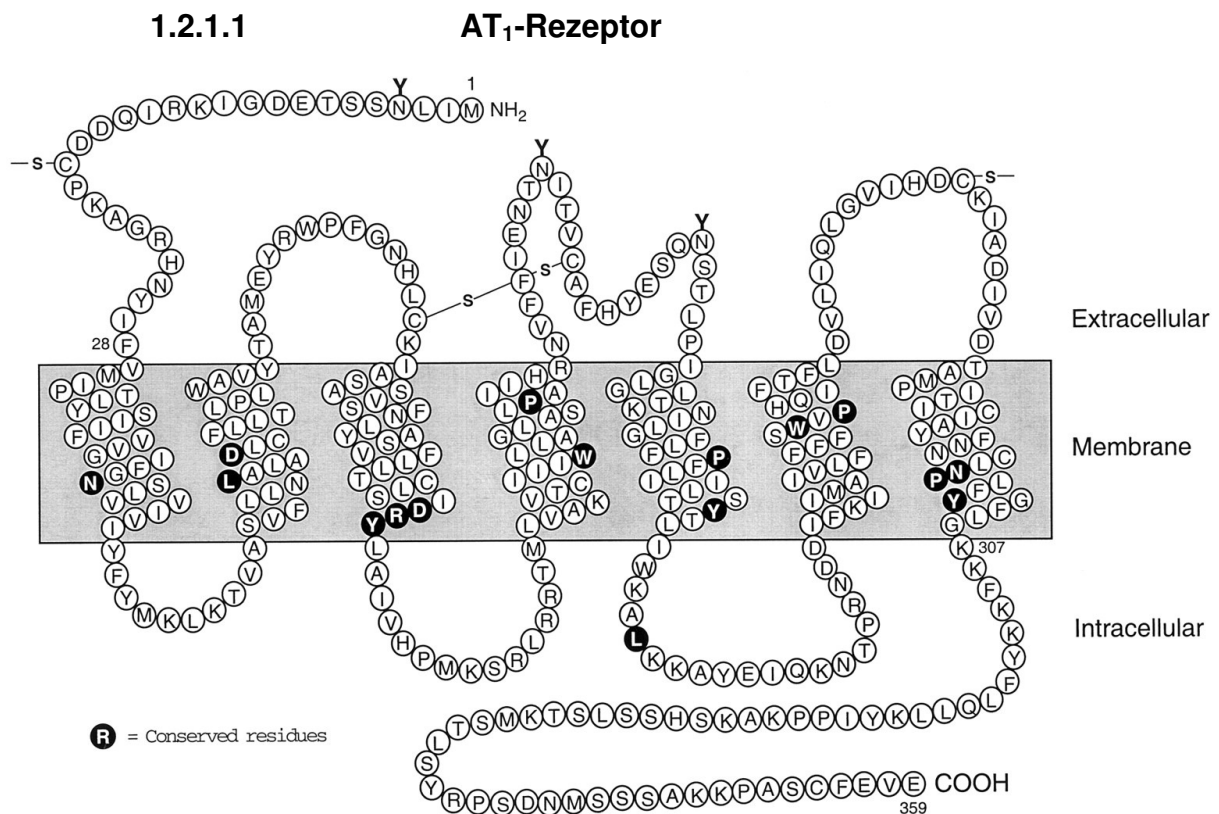


Abbildung 1-3: Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur des Säugetier-AT₁-Rezeptors
 Die gezeigte Sequenz basiert auf fünf unabhängig voneinander geklonten Säugetier-AT₁-Rezeptoren. Die dunkel unterlegten Felder zeigen die AS, die vielen G-Protein gekoppelten Rezeptoren gemeinsam sind. Die Y deuten die extrazellulären Kohlenhydratketten an. Übernommen von de Gasparo et al. [6].

Die Hauptrezeptorkaskade, über die der AT₁-Rezeptor seine Effekte vermittelt, ist die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, indem er über das G_{q/11}-Protein PLC-β aktiviert, die wiederum Phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphat in IP₃ und DAG

umwandelt. Es wird zwar auch PLC- γ aktiviert, dies geschieht aber nicht G-Protein-gekoppelt (s.u.).

Eine andere G-Protein-gekoppelte Rezeptorkaskade läuft über die nicht Pertussistoxin sensitive G_{12/13} Proteinfamilie, die in den Myozyten der Pfortader von Ratten L-Typ-Calciumkanäle aktiviert [7]. Auch eine Kopplung mit einem G_{i/o}-Protein ist beschrieben, wodurch die Adenylylcyclase gehemmt wird, was z.B. eine Steigerung der AGT-Produktion in der Leber zur Folge hat [8]. Ein unterzuordnender Effekt der G_i-Kopplung kann auch die Steigerung der PLC- β Aktivität sein. Ein moderater Anstieg von cAMP wurde unter ANG II zwar gefunden, doch wird hierbei eher davon ausgegangen, dass dies auf Ca²⁺-abhängige Adenylylcyclasen zurückzuführen ist.

Andere Postrezeptorsignalwege des AT₁-Rezeptors, wie die schon erwähnte Aktivierung von PLC- γ , sind eher einer Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors zuzuordnen. Diese Tyrosinkinaseaktivität wird durch das sogenannte YIPP Leitmotiv begründet. Phosphoryliertes YIPP, das auf dem intrazellulären Schwanz des Rezeptors liegt, kann mit der C-terminalen intrazellulären Domäne von PLC- γ 1 interagieren [9] und bedingt eine Tyrosinphosphorylierung. Dasselbe Motiv kann auch JAK2^{xxii}, wahrscheinlich unter Zuhilfenahme von Phosphotyrosin-Phosphatase-2 (SHP-2), als Adapterprotein aktivieren und somit den Jak/STAT^{xxiii}-Weg anstoßen [10, 11].

Eine weitere Tyrosinkinasekaskade, die durch den AT₁-Rezeptor aktiviert wird ist der MAPK^{xxiv}-Weg und ähnliche Stoffwechselwege, wodurch es zu einer Erhöhung der Expression von sogenannten early growth response genes kommt [12]. Die Aktivierung des MAPK-Wegs erfolgt über kleine G-Proteine also über den Ras-Raf^{xxv}-Weg. Dies kann Calcium-abhängig [13], über verschiedene PKC's (z.B.: PKC- ζ [14]) oder über die Tyrosinkinase pp60c-src [15] ablaufen. Der MAPK-Weg endet dann bei der Genablesung über ERK^{xxvi}1 und 2 oder c-Jun N-terminale Kinase (JNK). Dies führt zu Zellwachstum, Thymidinaufnahme und Proliferation [16].

^{xxii} JAK: Januskinase

^{xxiii} STAT: signal transducer and activator of transcription

^{xxiv} MAPK: mitogen activated protein kinase

^{xxv} Raf: rapidly growing fibrosarcoma

^{xxvi} ERK: extracellular-signal regulated kinase

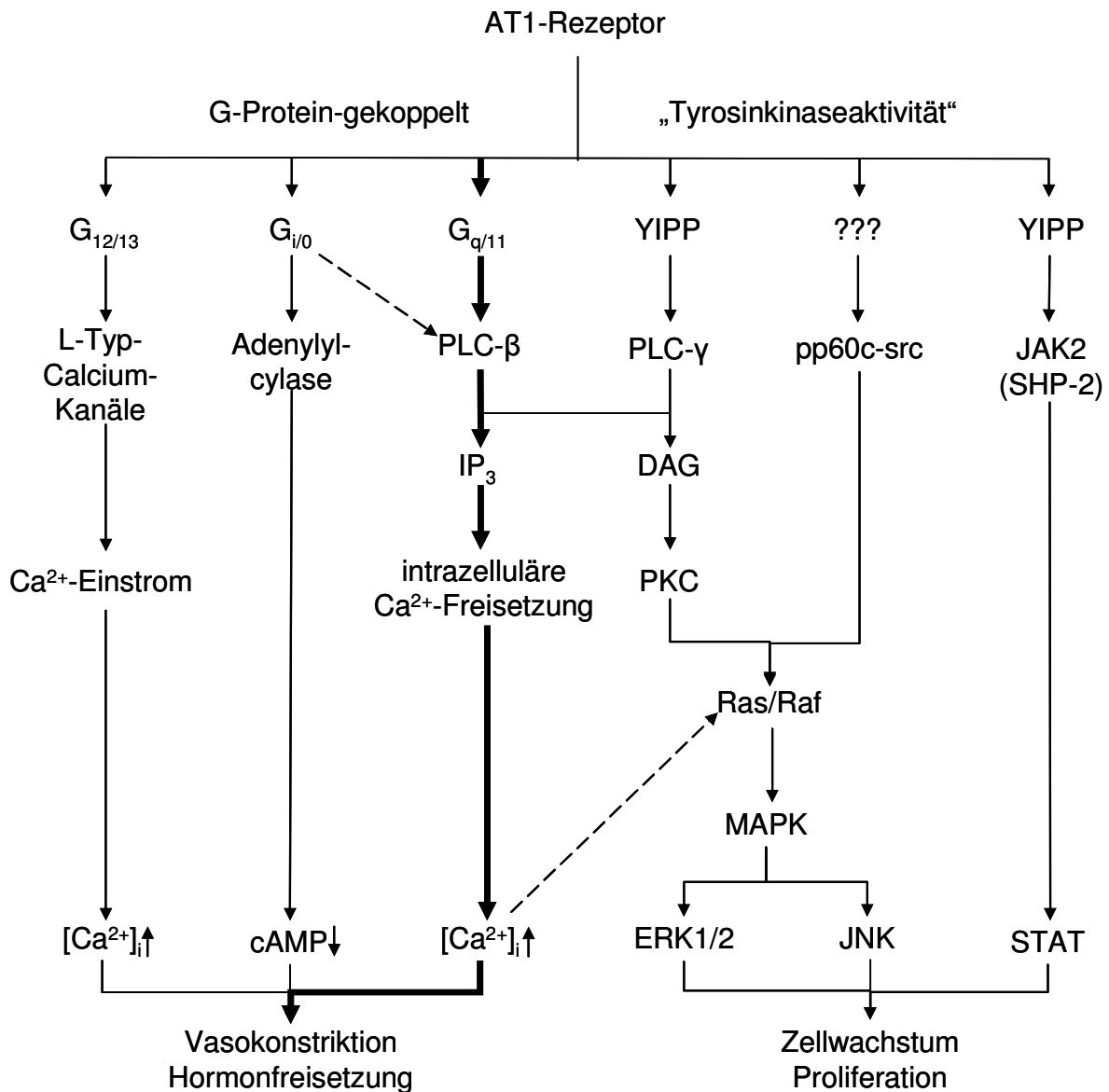


Abbildung 1-4: Signaltransduktion des AT₁-Rezeptors

Der Hauptweg ist durch den dicken Pfeil gekennzeichnet. Die gestrichelten Pfeile stellen Quervernetzungen dar. cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, DAG: Diacylglycerol, ERK: extracellular-signal regulated kinase, IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat, JAK2: Januskinase 2, JNK: c-Jun N-terminal kinase, MAPK: mitogen activated protein kinase, PKC: Proteinkinase C, PLC: Phospholipase C, Raf: rapidly growing fibrosarcoma, SHP-2: Phosphotyrosin-Phosphatase, STAT: signal transducer and activator of transcription,

Wie bei vielen anderen GPCR's führt die Bindung von ANG II zur Desensibilisierung und zur Internalisierung des Rezeptors. Für die Internalisierung ist u.a. die Aminosäuresequenz Ser-Thr-Leu im zytoplasmatischen Schwanz des AT₁-Rezeptors verantwortlich [17]. Diese Sequenz ist vielen GPCR's gemeinsam, die ähnlichen Mechanismen unterliegen. Beim AT₂-Rezeptor, der nicht internalisiert wird, ist diese Sequenz nicht präsent.

Für den AT₁-Rezeptor sind zwei Subtypen in Nagern beschrieben, die sich zwar nicht in ihren Eigenschaften bezüglich der Ligandenbindung und Aktivierung

unterscheiden, aber in der Gewebeverteilung, der chromosomalen Lokalisation, der Genstruktur und der Transkriptionsregulation [18-20]. Da bis jetzt bei anderen Säugern noch kein weiterer Genort für den AT₁-Rezeptor gefunden wurde, wird davon ausgegangen, dass es zu einer Genduplikation gekommen ist, und zwar nach der Abspaltung der Nager, aber noch bevor es die evolutionäre Trennung zwischen Ratte und Maus gab [21]. Zwar sind auch für den Menschen zwei verschiedene AT₁-Rezeptoren beschrieben, aber da wie bereits erwähnt noch kein weiterer Genlocus gefunden wurde, wird bis jetzt von zwei verschiedenen Splice-Varianten ausgegangen [22, 23], bei der die eine um 32 AS am N-terminalen Ende verlängert ist.

1.2.1.2 AT₂-Rezeptor

Der AT₂-Rezeptor gehört wie der AT₁-Rezeptor zu den GPCR's mit sieben hydrophoben, transmembranären Domänen, weist aber nur 32 % Aminosäuresequenzidentität zum AT₁-Rezeptor auf [24]. Die größte Homologie besteht bei den hydrophoben, transmembranären Domänen. Besonders gleichen sich die AS, die auch beim AT₁-Rezeptor für die Bindung von ANG II verantwortlich gemacht werden.

Der AT₂-Rezeptor ist weit verbreitet in fötalem Gewebe [25]. Nach der Geburt beschränkt sich die Verbreitung allerdings auf einige wenige Organe wie z.B. die Nieren, das Herz, das Gehirn, die Nebenniere, die Gebärmutter nicht schwangerer Frauen und die Ovarien. Außerdem kommt der AT₂-Rezeptor in mesenchymalem Gewebe der Zunge, der Haut und des Zwerchfells vor [26]. Dies deutet, zusammen mit dem Vorkommen in fötalem Gewebe, auf eine Beteiligung bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen hin.

Ein weiterer Hinweis für diese Annahme liegt darin, dass die AT₂-Rezeptor-Expression bei pathologischen Zuständen wie der Stauungs-Herzinsuffizienz, der Niereninsuffizienz, des Herzinfarktes, des Schlaganfalls, einer Gefäßverletzung und bei chirurgischer Durchtrennung des Ischias- oder Sehnervs hochreguliert ist.

In Neuronen aktiviert der AT₂-Rezeptor G_i-gekoppelt Protein Serin/Threonin Phosphatase (PP2A), wodurch K⁺-Kanäle geöffnet werden, was zur Hyperpolarisation führt [27]. Ebenfalls G_i-gekoppelt wird durch die besondere dritte intrazelluläre Schleife des AT₂-Rezeptors MAPK Phosphatas-1 (MKP-1) aktiviert, die ERK1 und 2 inaktiviert. Dadurch werden apoptotische Prozesse in Gang gesetzt [28].

Damit kann der AT₂-Rezeptor in Geweben, die beide AT-Rezeptoren exprimieren, die Wirkung des AT₁-Rezeptors antagonisieren.

Zwar gehört der AT₂-Rezeptor wie oben erwähnt zu den GPCR, doch sind die Effekte durch ihn, wie schon beim AT₁-Rezeptor, nicht alleine dadurch zu erklären. Andere apoptotische Abläufe in der Zelle können durch eine intrazelluläre Erhöhung von Ceramiden auftreten [29], was wiederum durch den AT₂-Rezeptor induziert werden kann. Über Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂) setzt der AT₂-Rezeptor Arachidonsäure frei, was über den Na⁺/HCO₃⁻-Symporter einen Einfluss auf den intrazellulären pH-Wert hat [30].

Wie schon bei den apoptotischen Prozessen erwähnt, scheint der AT₂-Rezeptor auch an anderen Stellen die Wirkungen des AT₁-Rezeptors zu antagonisieren. Um dies und andere Effekte des AT₂-Rezeptors zu untersuchen, wurden Experimente mit Mäusen, die sowohl AT₂-Rezeptoren überexprimieren als auch mit der sogenannten AT₂-null mouse, die keine AT₂-Rezeptoren exprimiert, durchgeführt. Bei einer Überexpression von AT₂-Rezeptoren am Herzen kam es zwar zu keiner morphologischen oder funktionalen Veränderung, aber eine Infusion mit ANG II führte zu einem verringerten Blutdruck und zu negativ chronotropen Effekten [31]. Außerdem kann der AT₂-Rezeptor Bradykinin freisetzen und dadurch über NO und cGMP den Blutdruck senken, was wiederum für eine dem AT₁-Rezeptor entgegengesetzte Wirkung spricht [32]. Durch gegenteilige Effekte bei der AT₂-null mouse bezüglich des Blutdrucks [33] und der renalen NO-Produktion [34] wird diese Vermutung weiter unterstützt. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen wurde aber noch über Veränderungen des Verhaltens und über vermehrte Nierenerkrankungen berichtet.

Eine andere Art wie der AT₂-Rezeptor die Wirkung des AT₁-Rezeptors antagonisieren kann, ist die Bildung von Dimeren mit dem AT₁-Rezeptor, wodurch die Wirkungen von ANG II am AT₁-Rezeptor verhindert werden [35].

1.2.1.3 IRAP, AT₄-Rezeptor

Obwohl der AT₄-Rezeptor wurde lange Zeit nur über seine pharmakologischen Eigenschaften definiert, bestand Einigkeit darin, dass es sich bei dem AT₄-Rezeptor nicht um einen klassischen G-Protein gekoppelten Rezeptor aus der Superfamilie mit ihren sieben transmembranären Domänen handelt. Nachdem durch Photoaffinitätsmarkierung (Crosslinking-Versuche) ein 165-kDa schweres Peptid als Bindungsstelle für ANG IV definiert werden konnte [36] und ein ähnliches Peptid in

der humanen Neuroblastoma Zelllinie SK-N-MC gefunden wurde [37], konnten Albiston et al. 2001 dieses Peptid als IRAP^{xxvii} identifizieren [38]. IRAP ist eine Zink-abhängige Aminopeptidase und gehört - wie APA^{xxviii} und APN^{xxix}, aber auch ACE - zur Familie der Gluzincin-Metalloproteasen. Weitere Namen für IRAP sind gp160 und vp165 bei Ratten oder Cystein Aminopeptidase und Oxytocinase (Otase) beim Menschen, für die eine 87 % ige Sequenzhomologie festgestellt wurde [39]. Ebenfalls identisch mit Otase ist plazentare Leucin-Aminopeptidase (P-LAP) [40]. IRAP ist ein integrales Membranprotein, bestehend aus 916 AS, bei dem die Aminopeptidaseaktivität auf der 785 AS langen extrazellulären Domäne zu finden ist. IRAP kommt hauptsächlich in Adipozyten und Skelettmuskelzellen vor, wo es mit GLUT 4 zusammen in Vesikeln gespeichert wird. Aber auch im Gehirn, dem Herz, der Niere und anderen Geweben, die ein lokales RAS aufweisen, kann IRAP nachgewiesen werden.

Durch die Interaktion von ANG IV mit IRAP kommt es zu verschiedenen Wirkungen. So werden die Erinnerungsleistung und das Lernen gesteigert, antiepileptische und antikonvulsive Effekte wurden gefunden, die striatale Dopaminfreisetzung wird erhöht, und es konnte ein Schutz vor cerebraler Ischämie gezeigt werden. Um diese unterschiedlichen Effekte zu erklären, gibt es verschiedene Versuchs- und Denkansätze.

ANG IV inhibiert die Enzymaktivität von IRAP [41], wodurch seine zahlreichen Substrate beeinflusst werden. So werden sowohl Oxytocin als auch Vasopressin in Adipozyten und Skelettmuskelzellen von IRAP defizienten Mäusen nicht vom N-terminalen Ende her abgebaut [41]. Dazu passend waren in diesen Mäusen die endogenen Vasopressinspiegel erhöht, und injiziertes Vasopressin hatte eine dreifach verlängerte Halbwertszeit (HWZ). Dies erklärt den Einfluss von IRAP auf den Blutdruck, aber auch die verbesserten Lernergebnisse, da Vasopressin das Erinnerungsvermögen steigert und in Versuchsanordnungen, bei denen es um Konditionierung geht, verstärkt freigesetzt wird [42, 43].

Ebenso könnten die antikonvulsiven Eigenschaften von ANG IV durch einen verminderten Abbau von Neuropeptiden erklärt werden. Nach intracerebroventrikulärer Injektion (i.c.v.) kam es zu einem extrazellulären Anstieg

^{xxvii} IRAP: Insulin regulierte Aminopeptidase

^{xxviii} APA: Aminopeptidase A

^{xxix} APN: Aminopeptidase N

von DA^{xxx} und Serotonin im Hippocampus. Dieser Anstieg konnte durch einen SST-Rezeptorantagonisten verhindert werden [44]. Dies zeigt, dass SST als mögliches IRAP-Substrat sehr indirekt verantwortlich für den antikonvulsiven Effekt in Frage kommt.

Ein anderer Ansatz die verbesserten Lerneffekte unter ANG IV zu erklären, ist über die Colokalisation von IRAP und GLUT 4 in denselben Vesikeln. Durch die Interaktion von ANG IV mit seinem Rezeptor könnte das Recycling von Glut 4 und damit sein Verbleib in der Zellmembran erhöht werden. Die daraus resultierende erhöhte Aufnahme von Glukose könnte eine verbesserte Stoffwechselsituation bedingen, die den verbesserten Lernerfolg erklären würde.

Für den Anstieg der striatalen extrazellulären DA-Spiegel gibt es eine weitere Theorie. Hier könnte IRAP als Rezeptor, der bestimmte intrazelluläre Signalwege in Gang setzt, fungieren. Die Theorie wird dadurch gestützt, dass der Effekt nicht durch einen Aminopeptidaseinhibitor reproduziert werden konnte, obwohl er in einer Konzentration eingesetzt wurde, bei der er die enzymatische Aktivität von IRAP inhibiert [45]. Außerdem ist die DA-Erhöhung AT₁ und AT₂ unabhängig [46].

1.2.1.4 Mas/ANG (1-7)-Rezeptor

Das Mas-Protoonkogen kodiert für einen Angiotensinrezeptor [47]. Dieser Mas-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit den üblichen sieben transmembranären Domänen. Der Rezeptor kommt hauptsächlich im Gehirn und den Testes vor [48].

Es gibt eine enge Verknüpfung zwischen der Signaltransduktion des AT₁-Rezeptors und dem Mas-Rezeptor/Protoonkogen. Erst wurde gezeigt, dass der knock-out des Mas Protoonkogen bei Mäusen zu einer Veränderung in der Variabilität des Blutdrucks und der Herzfrequenz führt [48]. In der Amygdala (Mandelkern, Corpus amygdaloideum) kam es durch den knock-out sogar zu einer umgekehrten Wirkung von ANG II [49]. Später wurde dann gezeigt, dass der Mas-Rezeptor mit dem AT₁-Rezeptor Heterooligomere bildet und dass es trotz einer gesteigerten Bindungsaffinität von ANG II zu einer geringeren Signaltransduktion kommt [50]. In einer weiteren Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass sich der Mas-Rezeptor und der AT₁-Rezeptor zusammenlagern, da die Coexpression des Mas-Rezeptors und

^{xxx} DA: Dopamin

einer nicht funktionalen AT₁-Rezeptor Doppelmutante zu einer Regenerierung der Bindungsaffinität und der Signaltransduktion für ANG II führte. Wenn der defekte Rezeptor alleine exprimiert wurde, konnte er nur im Cytosol gefunden. Wurde er hingegen mit dem Mas-Rezeptor zusammen exprimiert, konnte er auch in der Plasmamembran nachgewiesen werden [51].

1.2.2 Enzyme

1.2.2.1 Renin

Renin wird - wie sein Name schon verrät - in spezialisierten Zellen der Niere, dem sogenannten juxtaglomerulären Apparat gebildet [52, 53] und dort bis zu seiner Freisetzung in Granula gespeichert. Reize für seine Freisetzung können Blutdruckabfall, Hyponatriämie, aber auch eine sympathische Aktivierung über β -Rezeptoren sein. Renin besteht aus zwei homologen Peptidketten in deren Spalt sich das aktive Zentrum mit zwei Aspartat-Gruppen befindet. Hier spaltet Renin eine Leucin-Bindung und dadurch aus AGT ANG I ab. Das inaktive Proenzym Prorenin ist am N-terminalen Ende durch ein 43 AS langes Propeptid verlängert, das sich über das katalytische Zentrum legt. Die Konzentration von Prorenin im Blutplasma ist ca. 100-fach höher als die von Renin. Prorenin als inaktive Vorstufe von Renin kann sich nicht selbst aktivieren wie z.B. Pepsinogen [54]. Obwohl in *in vitro* Studien gezeigt wurde, dass Prorenin durch niedrigen pH, Trypsin oder Cathepsin D aktiviert wird, gibt es auch eine nicht proteolytische Aktivierung. Durch spezielle Antikörper gegen die Tertiärstruktur von Prorenin wurden am N-terminalen Ende von Prorenin zwei spezielle Regionen ausgemacht, die „gate“ und „handle“ genannt werden [54]. In einer weiterführenden Studie wurde gezeigt, dass spezifische Proteine mit der „handle“-Region interagieren und durch eine Konformationsänderung für die nicht proteolytische Aktivierung von Prorenin verantwortlich sind [55].

RENIN-REZEPTOREN

Einen Clearance-Mechanismus für Renin in Geweben stellt der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor dar. Sowohl Renin als auch Prorenin werden von ihm gebunden und dann in die Zelle aufgenommen [56, 57]. Nach der Aufnahme werden sie in Herzmuskelzellen sofort abgebaut [58]. Das dies wirklich ein Clearance-Mechanismus ist, wird dadurch gestützt, dass nach Aufnahme von (Pro-)Renin keine Angiotensinbildung stattfindet [59].

Ein weiterer, aber nicht so bedeutsamer, Weg Renin zu inhibieren ist das Renin Binding Protein (RnBP). RnBP was gleichbedeutend mit N-Acetyl-D-Glukosamin 2-Epimerase [60] und Teil von high molecular weight renin

ist [61], konnte durch einen knock-out bei Mäusen den Blutdruck nicht beeinflussen [62].

Des Weiteren gibt es einen spezifischen (Pro-)Renin-Rezeptor. Dieses 45 kDa schwere und aus 350 AS bestehende Protein hat eine einzelne transmembranäre Domäne und weist keine Ähnlichkeit zu anderen Membranproteinen auf [58, 63]. Die Wirkung des Rezeptors ist zweigeteilt. Zum einen bewirkt die Bindung von Prorenin die Aktivierung der MAP-Kinasen p(42) und p(44) und der ERK1 und 2. Dies hat hypertrophe Effekte zur Folge und auch die PAI-1 Produktion wird gesteigert. Zweitens ist er ein Cofaktor, der die Effektivität der ANG I Bildung erhöht. Dies geschieht zum über eine direkte Interaktion mit Renin und zum anderen kommt es, wie bereits beschrieben, durch eine Konformationsänderung zu einer nichtproteolytischen Aktivierung von Prorenin [64]. Außerdem wurde für den Rezeptor ein Zusammenhang zur geistigen Entwicklung und Wahrnehmung belegt [65].

1.2.2.2 ACE-1

Das ANG I converting enzyme (Kininase II, ACE-1, Peptidyl-dipeptidhydrolase) ist eine membrangebundene Zink-Metalloprotease, die hauptsächlich auf der Zelloberfläche von Epithelzellen des Lungenkreislaufs vorkommt [66, 67]. Die lösliche bzw. freie Form von ACE-1, die durch shedding, dem Abspalten des Membranankers durch ACE-Sekretase, freigesetzt wird, spielt nur eine untergeordnete Rolle [68].

Im klassischen RAAS spaltet ACE-1 das Dipeptid His-Leu am carboxyterminalen Ende des inaktiven ANG I ab, um so ANG II freizusetzen. Außer das ACE-1 das vasoaktive Peptid ANG II freisetzt, hat es noch eine sehr hohe Affinität zu Bradykinin und baut dieses ab [69]. Dies erklärt warum bei einer antihypertensiven Therapie mit ACE-Inhibitoren teilweise anfallsartiger Husten auftritt.

Ein weiteres Substrat von ACE-1 ist N-Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro (Ac-SDKP). Bei Ac-SDKP, einem negativen Regulator bei der Zellproliferation von pluripotenten Stammzellen [70] und damit für die Hämatopoese [71], wird durch ACE-1 am carboxyterminalen Ende das Dipeptid Lys-Pro abgespalten. Diese Spaltung kann bei *in vitro* Versuchen in Humanplasma durch ACE-Inhibitoren vollständig verhindert werden [72]. Dies wurde bei *in vivo* Studien belegt, wo es durch dauerhafte Behandlung mit ACE-Inhibitoren zu erhöhten Ac-SDKP Plasmaspiegeln kam. Deshalb wurde Ac-SDKP auch als Marker für eine erfolgreiche Therapie mit

ACE-Inhibitoren vorgeschlagen [73]. Diese erhöhten Plasmaspiegel von Ac-SDKP müssen aber noch differenziert betrachtet werden. Einerseits scheint Ac-SDKP antifibrotische Effekte zu haben [74], bei der Angiogenese [75] und bei Reparatur- und remodelling Prozessen am Herzen beteiligt zu sein, andererseits konnte eine Studie von van der Meer et al. zeigen, dass eine klare Korrelation zwischen ACE-Inhibition, Ac-SDKP-Plasmaspiegeln und Anämie besteht [76].

1.2.2.3 ACE-2

ACE-2 ist genau wie ACE-1 eine Zink-Metalloprotease und weist eine 42 %ige Strukturgleichheit zum katalytischen Zentrum von ACE-1 auf, jedoch mit nur einer einfachen Carboxypeptidaseaktivität [77, 78]. ACE-2 ist an der Bildung von nicht klassischen Angiotensinpeptiden beteiligt. So generiert es aus ANG I durch Abspaltung der carboxyterminalen AS das Nonapeptid ANG (1-9) und aus ANG II wird durch Entfernen des C-terminalen Phenylalanins ANG (1-7) [77, 79]. Ein weiteres Substrat von ACE-2 ist des-Arg-Bradykinin, aber nicht Bradykinin. Außerdem ist ACE-2 nicht durch ACE-Inhibitoren hemmbar.

ACE-2 kommt hauptsächlich an den Herzkranzgefäßen und den Epithelzellen des Tubulus in der Niere vor [80], wobei andere Expressionsstudien gezeigt haben, dass ACE-2 auch deutlich im Epithel der Lunge und des Dünndarms zu finden ist [81, 82]. Die durch die andersartige Enzymaktivität bedingte Bildung von ANG (1-7) als Gegenspieler von ANG II spricht zwar für eine bestimmte physiologische Rolle von ACE-2 in der Regulation des Blutdrucks und des Wasserhaushalts [78, 83], dies scheint aber nicht der Fall zu sein. Denn nachdem festgestellt wurde, dass das Gen, welches für ACE-2 kodiert, in einer Region auf dem X Chromosom liegt, die mit Bluthochdruckerkrankungen in Verbindung gebracht wird [84, 85], wurde in einem knock-out Modell an Mäusen nur ein geringer Einfluss auf den Blutdruck festgestellt [84]. Vielmehr zeigte sich eine Veränderung der Kontraktionskraft des Herzens, gesteigerte ANG II Konzentrationen und Induktion genetischer Reaktionen auf Hypoxie, was eher ein Zusammenhang von ACE-2 mit der Herzfunktion und -entwicklung vermuten lässt [84].

Ein weiteres noch unklares Forschungsgebiet bezüglich ACE-2 sind Lungenerkrankungen. Zum einen wurde gezeigt, dass ACE-2 ein Rezeptor für das

SARS^{xxxI}-Coronavirus, das die gleichnamige Lungenerkrankung zur Folge hat, ist [86, 87] und dass eine Blockade des RAS zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes führt. Zum anderen konnte aber auch gezeigt werden, dass ein acute respiratory distress syndrome (ARDS), das in vivo durch SARS oder andere Faktoren ausgelöst wird, im Tierversuch durch ACE-2 verhindert wird [87, 88].

1.2.2.4 Chymase

Chymase (human heart chymase) ist eine Serinprotease, die ACE-1-unabhängig ANG I zu ANG II abbaut [89] und kann deshalb auch nicht durch ACE-Inhibitoren gehemmt werden. Wie der Name schon sagt ist Chymase hauptsächlich im Herzen und noch genauer dort auf Mastzellen zu finden [90] und an pathophysiologischen Prozessen beteiligt [91]. Doch wie bei anderen Teilen des RAS ist auch die Chymase in anderen Geweben zu finden [92].

Die Produktion von ANG II im Herzen läuft fast ausschließlich über Chymase, da durch eine dauerhafte Therapie mit ACE-Inhibitoren die Konzentration an ANG II kaum gesenkt werden konnte [89].

Die pathophysiologischen Prozesse, an denen die Chymase beteiligt ist, sind Atherosklerose und cardiac remodelling bzw. Fibrose nach Myocardinfarkt [90, 93]. Dies wird nicht nur über den Abbau von ANG I zu ANG II, sondern auch noch über eine Aktivierung von TGF^{xxxII}- β vermittelt.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden spezifische Chymase-Inhibitoren wie z.B. NK320 entwickelt und getestet und erste Ergebnisse sehen hier sehr positiv aus [90, 93]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Fibrose als auch die Lipidablagerungen reduziert waren.

1.2.2.5 Bildung der Angiotensin Peptide

Die klassische Entstehung der Angiotensinpeptide beginnt mit dem Tetradecapeptid AGT, das zu ANG I durch Renin abgebaut wird. Weitere Enzyme, die AGT abbauen können, sind Tonin, Cathepsin G, tissue Plasminactivator und Chymase. ANG I kann dann entweder zu ANG II weiter prozessiert werden oder durch APA, einer Ectopeptidase, zu [des Asp1] ANG I (2-10) abgebaut werden. Hohe Aktivitäten von APA finden sich vor allem in der Niere [94] und im Gehirn [95].

^{xxxI} SARS: severe acute respiratory syndrome
^{xxxII} TGF: transforming growth factor

[des Asp¹] ANG I (2-10) ist eine interessante Zwischenstufe, weil so durch ACE-1 ANG III und später ANG IV entstehen kann, ohne dass ANG II gebildet wird. APA ist auch hauptverantwortlich für den Abbau von ANG II zu ANG III, das zentrale Angiotensinrezeptoren bedient. APN hat eine breite Substratspezifität bei Peptiden, die eine endständige neutrale Aminosäure besitzen. Es baut nicht nur ANG III zu ANG IV ab, sondern auch noch Enkephaline, Dynorphin und Substanz P. APB^{xxxiii} kann zwar auch ANG III zu ANG IV abbauen, aber nur nach Internalisierung von ANG II, da sie nur intrazellulär zu finden ist [96]. Deshalb ist APB als untergeordnete Möglichkeit der ANG IV-Bildung zu betrachten. ANG IV kann zusätzlich zur Bildung aus ANG III auch direkt aus ANG II gebildet werden. DPA III^{xxxiv}, die cytosolisch in Rattenhirnen gefunden wurde [97], kann das Asp-Arg Dipeptid direkt abspalten. Aber wie APB spielt DPA III nur eine unwesentliche Rolle bei der Bildung von Angiotensinpeptiden.

PEP^{xxxv} kann die Pro-Phe-Bindung von sowohl ANG I als auch ANG II spalten, was zu ANG (1-7) führt. Als Inhibitor für PEP steht N-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal zu Verfügung [98]. Die Hemmung führt aber in den meisten Geweben nur zu einer geringen Verringerung der ANG (1-7)-Bildung, woraus hervorgeht, dass PEP nur eine untergeordnete Rolle als Peptidase zur ANG (1-7)-Bildung spielt. Das Enzym, das für den größten Teil der ANG (1-7)-Produktion verantwortlich ist, ist NEP^{xxxvi}. Es kann ANG (1-7) aus ANG II bilden, aber auch direkt aus ANG I. Eine weitere Stelle an der NEP enzymatische Aktivität zeigt ist die Tyr⁴-Ile⁵-Bindung, wodurch die inaktiven Angiotensinpeptide ANG II (1-4) und (5-8) entstehen. Die 90 kDa schwere NEP ist auch als Enkephalinase bekannt, spaltet im Gehirn β -Amyloid und ist somit in die Alzheimer Krankheit involviert. Weitere Enzyme, die ANG (1-7) bilden können, sind Thimet Oligopeptidase (TOP) aus glatten Muskelzellen [99] und Carboxypeptidase P (CPP).

Das Angiotensinpeptid ANG-(1-9) kann über ACE-2 und CPA^{xxxvii} entstehen. CPA kommt hauptsächlich in Mastzellen vor [100] und ist am Herzen zusammen mit Chymase, welche auch in Mastzellen zu finden ist, hauptverantwortlich für die Bildung von Angiotensinpeptiden.

^{xxxiii} APB: Aminopeptidase B

^{xxxiv} DPA III: Dipeptidylaminopeptidase III

^{xxxv} PEP: Prolylendopeptidase

^{xxxvi} NEP: neutrale Endopeptidase, Neprilysin

^{xxxvii} CPA: Carboxypeptidase A

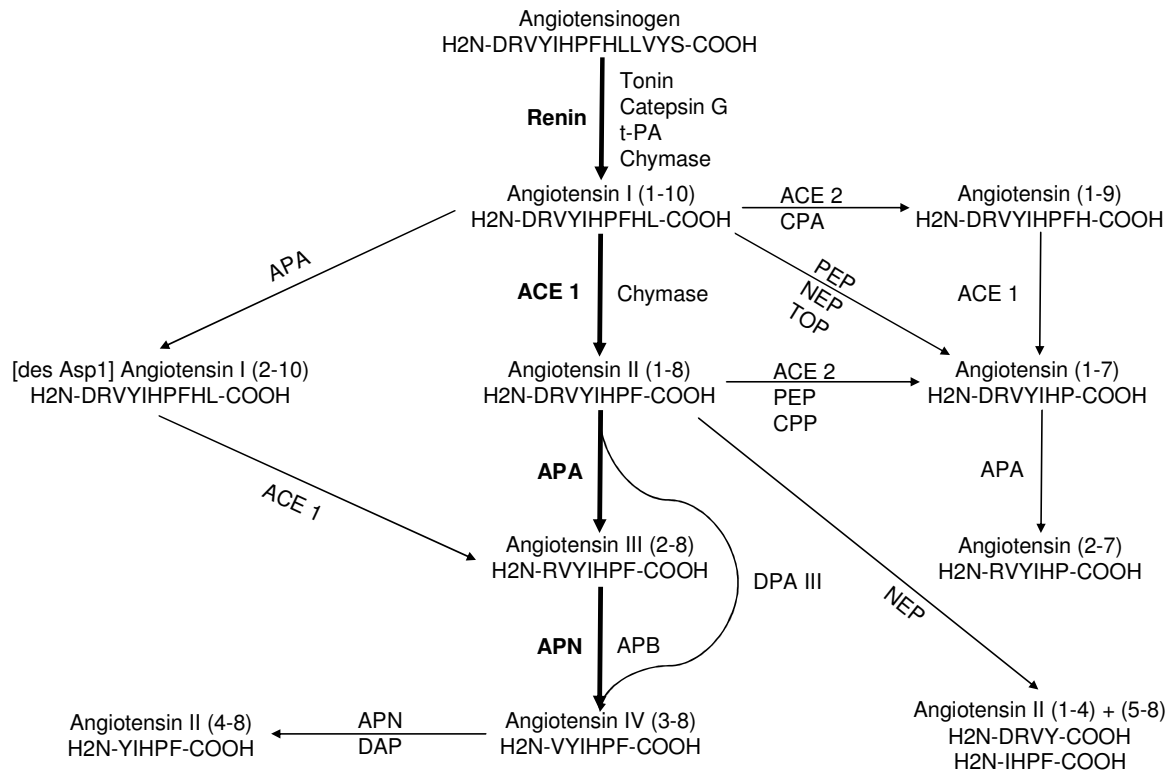


Abbildung 1-5: Darstellung der Bildung der Angiotensinpeptide

Auf der Mittelachse ist der typische, ACE-abhängige Bildungsweg mit den klassischen Enzymen fett dargestellt. Daneben werden zusätzliche Bildungswege der klassischen Angiotensinpeptide durch weitere Enzyme und Nebenwege gezeigt.

t-PA: tissue Plasminogenactivator, CPA+P: Carboxypeptidase A+P; PEP: Prolylendopeptidase; NEP: neutrale Endopeptidase; TOP: thimet Oligopeptidase; DPA III: Dipeptidylaminopeptidase III; APB: Aminopeptidase B

1.2.3 Peptide

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Beschreibungen der Peptide des RAS geben nur grundsätzliche Eigenschaften wieder. Detaillierte Ausführungen der Wirkungen sind in Kapitel [1.2.1] über die Rezeptoren des RAS zu finden.

1.2.3.1 Angiotensinogen

AGT ist ein α 2-Glykoprotein, das hauptsächlich in der Leber gebildet wird [101-103]. Von hier wird es in den Blutkreislauf abgegeben, wo durch Renin das Dekapeptid ANG I abgespalten wird. Außerdem wird es wie viele andere Komponenten des RAAS auch in lokalen Systemen gebildet.

1.2.3.2 Angiotensin II

Das Octapeptid ANG II wird aus dem inaktiven Decapeptid ANG I durch ACE-1 gebildet [104]. ANG II ist das Haupteffektorpeptid des klassischen RAAS. Es wirkt vasokonstriktorisch an glatten Muskelzellen der Gefäße und setzt Aldosteron aus Zona glomerulosa der Nebennierenrinde frei [105].

1.2.3.3 Angiotensin III

ANG III, das durch APA aus ANG II entsteht, ist das Angiotensinpeptid, welches im Gehirn für die Blutdruckregulation verantwortlich ist. Die zentralen Wirkungen, die klassisch ANG II zugeordnet sind, werden hauptsächlich durch das weiter prozessierte ANG III über den AT₁- und AT₂-Rezeptor vermittelt, wodurch Stoffen wie RB150 als APA-Inhibitor eine ganz neue Bedeutung zugemessen werden muss [95].

1.2.3.4 Angiotensin IV

Durch den Abbau von ANG III durch APN entsteht ANG IV. Im Gehirn wird ANG IV hauptsächlich intrazellulär gebildet und gespeichert [106]. An chromaffinen Zellen aus dem Nebennierenmark konnte gezeigt werden, dass ANG II zu 80 % zu ANG IV abgebaut wird [96], was zeigt, dass es sich hier nicht um einen einfachen Abbau von ANG II handelt, sondern um eine gezielte Bildung eines weiteren aktiven Angiotensinpeptids. Über die Bildung von ANG IV in anderen Geweben ist bis jetzt nicht viel bekannt, aber theoretisch kann jedes Gewebe, das die entsprechenden Peptidasen wie z.B. APA und APN enthält (vgl. Abbildung 1-5) ANG IV bilden.

1.2.3.5 Angiotensin (1-7)

ANG (1-7) entsteht durch carboxyterminalen Abbau von ANG I durch neutrale Endopeptidasen sowie Prolylendopeptidase und neutrale Endopeptidase 24.11 [107]. Die Wirkungen von ANG (1-7) sind meist entgegengesetzt derer von ANG II [108, 109].

1.3 Das Renin-Angiotensin-System des Pankreas

Das RAS des Pankreas gehört zu den lokalen oder Gewebe Renin-Angiotensin-Systemen. Der Gedanke, dass es auch lokale RAS gibt, kam dadurch auf, dass Enzyme, Peptide und Rezeptoren des klassischen RAAS in Geweben gefunden wurden, in denen sie primär nicht zu erwarten waren und deren Bedeutung nicht sofort deutlich war [110, 111]. Diese lokalen Systeme sind aber keine abgeschlossenen Einheiten. Sie können mit dem endokrinen RAAS und auch anderen Peptidsystemen interagieren [112]. Dabei agieren lokale RAS auf autokrine, parakrine und/oder auf intrakrine Weise. Neben dem Einfluss auf die Hämodynamik beeinflussen lokale RAS das Wachstum, die Differenzierung, Proliferation und die Apoptose von Zellen, die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, Gewebsentzündung und -fibrose und hormonale Sekretion [113]. Durch diese mannigfaltigen Wirkungen der lokalen RAS werden sie zu einem interessanten therapeutischen Ziel bei vielen Erkrankungen. Die Existenz eines lokalen RAS im Pankreas mit fast allen Komponenten des klassischen RAS wird durch vielfältige Untersuchungen bestätigt, wobei auch divergente Resultate vorliegen.

BESTANDTEILE DES PANKREATISCHEN RAS

Renin mRNA wurde im Gefäßbindegewebe und in retikulären Fasern in humanen Inseln gefunden [114]. Das Protein hingegen wurde in β -Zellen und dem Gefäßendothel des Pankreas nachgewiesen, was vermuten lässt, dass Renin vom Bildungsort sezerniert und wie in anderen Geweben an anderer Stelle aktiv aufgenommen wird [56]. Neben dem Nachweis von Renin mRNA in humanen Pankreas, wurde sie auch im Rattenpankreas gefunden [115], wohingegen es im Hundepankreas keinen Hinweis auf Renin gab [116].

Auch für AGT gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Wurde 1986 von Campbell und Habener im Rattenpankreas noch keine mRNA für AGT gefunden [117], so konnten durch Leung et al. 1999 sowohl mRNA als auch Protein nachgewiesen werden [115]. Weitere Spezies bei denen AGT sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im Pankreas gefunden wurde sind der Hund [116] und der Mensch [118], bei dem AGT vor allem in den Inselzellen vorkam. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können durchaus auf veränderten Versuchsbedingungen und/oder verbesserten analytischen Methoden, wie spezifischeren Antikörpern beruhen.

ANG II als etabliertes Effektorpeptid des RAS wurde hauptsächlich in den Endothelzellen pankreatischer Blutgefäße und den Epithelzellen der Sekretgänge bei der Maus gefunden. Glatte Gefäßmuskelzellen und Azinuszellen enthielten geringere Mengen und Inselzellen gar kein ANG II [119]. Von Chappell et al. wurde ANG II auch im Hundepankreas nachgewiesen [116]. In dieser Studie wurden auch andere Angiotensinpeptide gefunden, aber es wurden keine Aussagen über Verteilung oder Wirkungen gemacht. Dies ist bis dato auch so geblieben. Es gibt nur vereinzelte Studien über Nachweise von Angiotensinpeptiden im Pankreas, aber kaum Aussagen über Wirkungen oder genaue Verteilung.

Auch die klassischen Angiotensinrezeptoren AT₁ (a und b in Nagern) und AT₂ lassen sich im Pankreas finden. Es gibt Bindungsstellen für ANG II sowohl im exo- als auch im endokrinen Teil des Pankreas. Im Hundepankreas kommen hauptsächlich AT₂-Rezeptoren vor [120], wie auch in der Azinustumor-Zelllinie AR42J. Doch konnte eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration hier nur über den AT₁-Rezeptor festgestellt werden [121]. Im Pankreas der Ratte konnte sowohl die mRNA für AT_{1a}-, AT_{1b}- und AT₂-Rezeptoren belegt werden [115], als auch die Rezeptoren selbst wurden gefunden [122]. In der Studie, in der die Angiotensinrezeptoren auf Proteinebene im Pankreas der Ratte nachgewiesen wurden, konnten sie auch alle an der Maus belegt werden. Überraschenderweise zeigte sich, dass die Bindungsaffinität von ANG II für seinen Rezeptor abhängig ist von der Natriumkonzentration im Plasma, indem eine erhöhte Natriumkonzentration die Bindungsaffinität und -kapazität senkte [123]. AT₁-Rezeptoren im humanen Pankreas konnten in β -Zellen der Langerhans'schen Inseln und den Endothelzellen pankreatischer Gefäße [114] aufgezeigt werden. Außerdem fand sich der Rezeptor in den Sekretgängen des Pankreas [118]. Gezeigt werden konnte ebenfalls, dass der mRNA-level für den AT₂-Rezeptor in endokrinen Pankreastumoren im Vergleich zu gesunden Bauchspeicheldrüsen erhöht ist.

Über ANG IV den AT₄-Rezeptor bzw. IRAP ist im Pankreas soweit nichts bekannt. Den ersten Beweis für die Existenz von IRAP konnte Siebelmann et al. in unserem Labor erbringen (nicht veröffentlicht). Das Protein für IRAP wurde durch Western Blotting nachgewiesen.

REGULATIONSMECHANISMEN DES PANKREATISCHEN RAS

Das RAS des Pankreas kann durch verschiedene, aber vor allem durch pathologische Veränderungen, in seiner Expression verändert werden. So tritt eine Modifikation der RAS-Komponenten durch kanzeröse Entartung, T2DM^{xxxviii}, Hypoxie, Hyperglykämie, zystische Fibrose und Inseltransplantation auf.

Durch chronische Hypoxie werden AGT, der AT_{1b}- und der AT₂-Rezeptor heraufreguliert, wohingegen die Genexpression für den AT_{1a}-Rezeptor unverändert bleibt [124]. Dieser Effekt, der durch chronische Hypoxie induziert ist, normalisiert sich nach einiger Zeit, wenn wieder normale Sauerstoffverhältnisse herrschen [125]. Hypoxie verursacht in vielen Geweben und auch dem Pankreas einen verminderten Blutfluss und führt zu einer Gewebsentzündung und -verletzung [126]. Dieser verminderte Blutfluss unter Hypoxie könnte mit dem RAS in Zusammenhang stehen, da ANG II die Blutzufuhr zu den Langerhans'schen Inseln vermindert [127]. Neben Hypoxie kann auch eine akute Pankreatitis das RAS des Pankreas heraufregulieren [128]. Des Weiteren ist die Expression auch in endokrinen Pankreastumoren verändert [118] und eine ACE-Blockade variiert sowohl die Genexpression als auch die Mitose bei Krebszellen aus dem Pankreasgang des Hamsters [129].

Außerdem wird die Expression des pankreatische RAS noch durch Inseltransplantation, Hyperglykämie und T2DM verändert, wobei auf den letzten Punkt noch näher unter 1.3.2 eingegangen wird. So ist Genexpression verschiedener RAS-Komponenten in Inseln erhöht, die aus vier Wochen alten Transplantaten stammen [130] und ebenso in Inseln aus Tieren, die ein Modell für T2DM darstellen [131, 132]. Außerdem tritt eine Veränderung unter Hyperglykämie bei Inseln [133] und pankreatischen Sternzellen auf [134].

^{xxxviii} T2DM: Typ 2 Diabetes mellitus

Spezies, Zelllinie	RAS-Komponente							Literatur
	Renin	ACE	AGT	ANG II	AT ₁	AT ₂	AT ₄	
Hund	-	-	+	+	+?	+?	-	Chappel et al. 1991
	-	-	-	-	+	+	-	Chappel et al. 1992
	-	-	-	-	+	-	-	Fink et al. 2002
Ratte	-	-	-	-	-	-	-	Campbell & Habener 1986
	-	-	-	-	+?	+?	-	Ghiani & Masini 1995
	-	-	-	-	+	+	-	Leung et al. 1997
	+	-	+	+	+(a+b)	+	-	Leung et al. 1999
	-	-	+	-	+(a+b)	+	-	Chan et al. 2000
	-	+	+	-	+	+	-	Ip et al 2003
	-	+(1+2)	-	-	+	-	-	Tikellis et al. 2004
	-	-	+	-	+	+	-	Tsang et al. 2004
	-	-	-	-	-	+	-	Wong et al. 2004
Maus	-	-	-	-	+	+	-	Leung et al. 1997
	-	-	-	+	-	-	-	Leung et al. 1998
Mensch	+	-	-	-	+	-	-	Tahmasebi et al. 1999
	-	-	+	-	+	+	-	Lam & Leung 2002
Maus isolierte Inseln	-	+	+	-	+	+	-	Lau et al. 2004
	-	-	-	-	+	-	-	Chu et al. 2006
Mensch isolierte Inseln	-	+	+	-	+	-	-	Ramracheya et al. 2006
	-	+	+	-	+	-	-	Lupi et al. 2006
Ratte isolierte Azinuszellen	-	-	+	-	+	+	-	Tsang et al. 2004
MIN-6 Zellen	-	-	-	-	+	-	-	Ramracheya et al. 2006
INS-1 Zellen	-	-	-	-	-	-	+	Siebelmann et al.
CFPAC-1 Zellen	-	-	-	-	+	-	-	Fink et al. 2002
RIN-m, RIN-14B	-	-	-	-	-	+	-	Wong et al. 2004
AR4-2J	-	-	-	-	+	+	-	Chappel et al. 1995
	-	-	-	-	+(a)	-	-	Cheung et al 1999
Pankreatische Sternzellen der Ratte	-	-	-	-	+	-	-	Ko et al 2006

Tabelle 1-2: Verteilung verschiedener Komponenten des pankreatischen RAS in unterschiedlichen Spezies und Zellkulturen

-: wurde nicht untersucht/gefunden; +: wurde nachgewiesen;

+?: Subtypenunterscheidung wurde nicht gemacht; in Klammern sind Subtypen angegeben

1.3.1 Das exokrine Pankreas

Durch verschiedene Studien wird belegt, dass das pankreatische RAS in die Regulation der Ductus-Zellen und das Sekretionsverhalten des exokrinen Pankreas eingreift. Über den AT₁-Rezeptor vermittelt kommt es an den Zellen der pankreatischen Ausführungsgänge zu einer Veränderung der Anionensekretion. Mit Hilfe einer ISC^{xxxix}-Technik konnte gezeigt werden, dass ANG II in CFPAC-1 Zellen, einer Zelllinie, die ein Modell für die zystische Fibrose darstellt, dosisabhängig den ISC steigert. Der Kurzschlussstrom war Cl⁻-abhängig und konnte durch DIDS, einen Chloridkanalmodulator, und Losartan unterdrückt werden. Die Sekretionssteigerung ging mit einer Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ einher und konnte nur durch eine Entleerung intrazellulärer Speicher, aber nicht durch Calciumentzug aus dem umgebenden Puffer, gehemmt werden [135]. Durch Cheng et al. wurde zusätzlich noch gezeigt, dass Inkubation mit Pertussistoxin und dem PLC-Inhibitor U73122 die Anionensekretion, die durch ANG II gesteigert wird, wieder auf den Basalwert zurückgeht. Dies zeigt die Involvierung einer G_q-Proteinkopplung und der PLC. Aber auch eine Erhöhung von cAMP konnte mittels RIA^{xl} gezeigt werden [136]. Auch in Ductus-Zellen des Hundes, die in ihrem Verhalten mit CFPAC-1 Zellen verglichen wurden, konnte sowohl apikal als auch basolateral appliziertes ANG II die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen [137]. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen reduzierte eine Captopril-Infusion bei Hunden *in vivo* eine durch Sekretin induzierte Bicarbonatsekretion [138].

In AR42J Zellen, einer pankreatischen Azinus-Zelllinie, die zwar hauptsächlich AT₂-Rezeptoren besitzen und bei denen nur 10-15 % der ANG II-Bindungsstellen auf den AT₁-Rezeptor entfallen, erhöht ANG II die intrazelluläre Calciumkonzentration über den AT₁-Rezeptor, denn die Erhöhung konnte nur durch Losartan und nicht durch die AT₂ spezifischen Rezeptorblocker CGP42112A und PD123177 verhindert werden [121]. In der gleichen Zelllinie steigert ANG II über der AT₁-Rezeptor die Amylase-Sekretion und die Bildung von IP₃ [139]. Neben der Zellkultur konnte auch in Azinuszellen von Ratten AGT, AT₁- und AT₂-Rezeptoren nachgewiesen werden. Außerdem wird die Expression dieser RAS-Komponenten durch eine akute

^{xxxix} ISC: short circuit current (semiconductor device property)

^{xl} RIA: Radioimmunoassay

Pankreatitis noch erhöht. Sowohl in den entzündeten als auch in den Kontroll-Azini wurde durch ANG II die Sekretion der Verdauungsenzyme Lipase und Amylase dosisabhängig gesteigert und auch hier konnte der sekretionssteigernde Effekt von ANG II nur durch Losartan aber nicht durch PD123319, einem spezifischen, nicht peptidischen AT_2 -Rezeptorantagonisten, gehemmt werden [140]. Zusammengenommen scheint auch in den Azinuszellen des Pankreas die klassische G_q -Kopplung des AT_1 -Rezeptors mit anschließender Aktivierung der PLC und Erhöhung des IP_3 - und intrazellulären Calciumspiegels vorzuliegen. Hierdurch kommt es dann zu einer erhöhten Sekretion der Verdauungsenzyme.

Neben der physiologischen Bedeutung, die ANG II auf die Sekretion von Verdauungsenzymen und die Anionen-Freisetzung in den pankreatischen Sekretgängen hat, scheint das RAS des Pankreas auch eine Bedeutung bei Erkrankungen des exokrinen Pankreas und der Pankreatitis zu haben. Um diese Aspekte näher zu untersuchen, wurde in verschiedenen Tiermodellen die Auswirkung einer RAS-Blockade untersucht. Sarile^{XLI} kann als partieller AT_1/AT_2 -Rezeptorantagonist eine Verletzung, die durch eine akute Pankreatitis (Cerulein induziert, einem Decapeptid aus *Hyla caerulea*, das CCK in seiner Struktur ähnelt, aber sehr viel potenter ist) bei Ratten entsteht, bei prophylaktischer Gabe, abmildern. Eine Gabe von Ramipril in der gleichen Versuchsanordnung hat hingegen einen negativen Effekt [141]. Der Effekt von Ramipril in dieser Studie lässt vermuten, dass ACE hier nicht an der Entstehung von ANG II beteiligt zu sein scheint [1.2.2.5]. Der Einfluss von Sarile hingegen könnte dadurch begründet sein, dass es nicht zu einer Aktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies durch das pankreatische RAS kommt [142]. Neben Sarile lässt sich auch mit einer prophylaktischen und therapeutischen Gabe von Losartan der durch eine Pankreatitis induzierte oxidative Stress reduzieren. Nicht verhindern lässt er sich mit dem AT_2 -Rezeptorantagonisten PD123319. Losartan verbessert die pankreatische Mikrozirkulation und verhindert die über den AT_1 -Rezeptor vermittelte NADPH-Oxidase abhängige Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies [143]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine AT_1 -Rezeptorblockade sowohl gegen die Cerulein-induzierte akute Pankreatitis als auch gegen assoziierte Lungenerkrankungen prophylaktisch wirksam ist [144]. In einem Modell für eine obstruktive Pankreatitis, bei dem der Pankreasgang

^{XLI} Sarile: (Sar1;Ile8)-Angiotensin II (1-8)

abgebunden wird, wurde durch eine AT₁-Rezeptorblockade durch Losartan die NADPH-Oxidase Aktivität gesenkt. Dadurch wurde NFκB^{XLII} weniger aktiviert und es kam zu einer Verbesserung der Entzündungssituation [145]. Neben diesen Ergebnissen wurde durch den ACE-Hemmer Lisinopril bei WBN/Kob^{XLIII}-Ratten, einem Modell für spontane Pankreatitis und spontanen Diabetes, die Pankreatitis bedingte Gewebsschädigung und die pankreatische Fibrose gemildert. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass weniger TGF-β1 exprimiert wird und dadurch weniger pankreatische Sternzellen aktiviert werden [146]. Ein ähnliches Ergebnis wurde durch Wang et al. mittels Losartan gezeigt. Bei einer durch Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) erzeugten, akuten Pankreatitis, bei männlichen Sprague-Dawley Ratten, wurde die Apoptose von Azinuszellen und die pankreatische Fibrose durch Losartan abgemildert [147].

Zusammenfassend kann man sagen, dass je nach Grundsituation ANG II im exokrinen Pankreas zwei Funktionen hat. Physiologisch kann es über den AT₁-Rezeptor PLC vermittelt eine Steigerung der Sekretion von Verdauungsenzymen hervorrufen. Bei pathophysiologischen Situationen wie einer Pankreatitis kommt es, wie auch in anderen Organen und anderen Krankheitsbildern, wie Hypertension, Niereninsuffizienz, Atherosklerose und Herzinsuffizienz, zu einer Verschlechterung der Krankheitssituation durch ANG II [148-151].

^{XLII} NFκB: nukleärer Faktor κB
^{XLIII} WBN/Kob: Wistar Bonn/Kobori

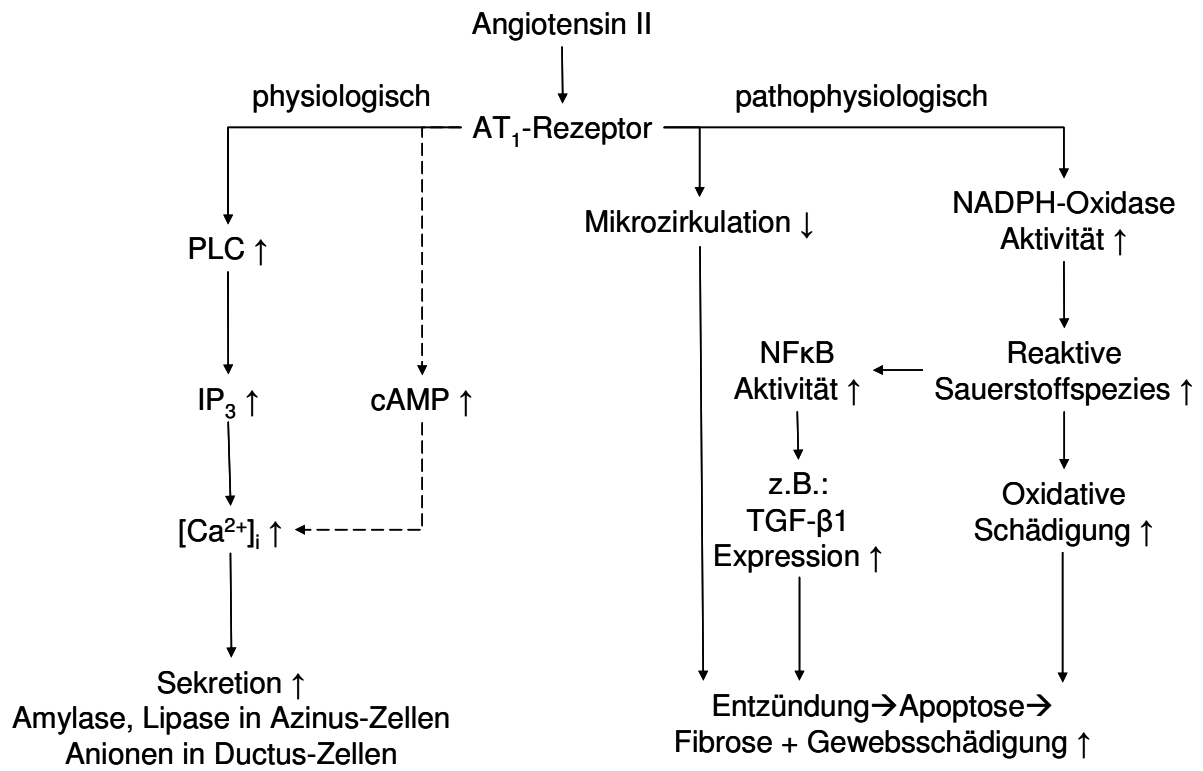


Abbildung 1-6: Physiologische und pathophysiologische Rezeptorkopplung des AT₁-Rezeptors im exokrinen Pankreas

1.3.2 Das endokrine Pankreas

Neben dem exokrinen Pankreas besitzt, wie schon erwähnt, auch das endokrine Pankreas ein RAS. Wie auch im exokrinen Pankreas spielt das RAS eine bedeutende Rolle bei pathophysiologischen Veränderungen. Vor allem der T2DM muss hier Erwähnung finden. In einer Reihe von klinischen Studien hat es Anzeichen dafür gegeben, dass eine Blockade des RAS die Häufigkeit der Entstehung eines T2DM bei Hochrisikopatienten mit kardiovaskulären Erkrankungen vermindern kann. Um diese protektiven Aspekte näher zu untersuchen, wurden Metaanalysen von klinischen Studien, bei denen ACE-Inhibitoren oder AT₁-Rezeptorantagonisten zum Einsatz kamen, gemacht [152, 153]. In der Studie von Abuissa et al. wurde ein verringertes Risiko für sowohl ACE-Inhibitoren als auch AT₁-Rezeptorantagonisten gefunden. Die Behandlung mit ACE-Inhibitoren verminderte das Risiko einer Neuerkrankung an T2DM um 27 %, die Behandlung mit AT₁-Rezeptorantagonisten um 23 % und bei Kombination der Daten wurde das Risiko dementsprechend um 25 % reduziert. Der exakte Mechanismus, wie dieser protektive Effekt zustande kommt, ist zwar noch unklar, stellt aber einen interessanten Aspekt bezüglich Multimorbidität bei Patienten dar. Um diese Zusammenhänge aufzudecken, könnte das RAS des endokrinen Pankreas bei pathologischen Veränderungen des Pankreas ein neuer, alternativer Ansatz für Erklärungen sein, da es schon viele Hinweise dafür gibt, dass eine RAS-Blockade die Insulinsensitivität und die Glukosetoleranz in peripheren Geweben erhöht [154, 155]. Um diese Zusammenhänge im endokrinen Pankreas näher zu untersuchen, wurden einige Tiermodelle speziell für dieses Forschungsthema entwickelt. Ein Langzeiteffekt von ACE-Inhibitoren wurde an OLETF^{XLIV}-Ratten untersucht. Dieser Rattenstamm, der aus dem 1983 eingeführten Long Evans Stamm gezüchtet wurde, entwickelt meist in männlichen Exemplaren eine Hyperglykämie, eine Hyperinsulinämie und eine leichte Fettleibigkeit, was einem T2DM beim Menschen entspricht. Eine 24-wöchige Gabe von Ramipril verminderte den Gewichtszuwachs und erhöhte die Glukosetoleranz. Außerdem wurde die Zerstörung von Inseln durch Fibrose und die TGF- β -Expression mit seinen nachgeschalteten Signalmolekülen im Pankreas reduziert [156]. Auch bei

^{XLIV} OLETF: Otsuka Long-Evans Tokushima fatty

ZDF^{XLV} Ratten konnten Perindopril als ACE-Hemmer und Irbesartan als AT₁-Rezeptorantagonist bei einer 10-wöchigen Gabe die Fibrose und die TGF- β -Expression senken. Dadurch konnte die Struktur der pankreatische Inseln erhalten und die Insulinsekretion verbessert werden [132]. Diese beiden Studien zeigen, dass oxidativer Stress zu Apoptose und Fibrose und damit zur Funktionsstörung von pankreatischen Inseln bei T2DM führt. Neben der Erkrankung des T2DM kann auch eine durch die Krankheit bedingte Hyperglykämie das RAS in pankreatischen Sternzellen und Inseln aktivieren. Dadurch kommt es bedingt durch oxidativen Stress zu pankreatischer Entzündung und Fibrose, die durch eine RAS-Blockade durch ACE-Hemmer oder AT₁-Rezeptorantagonisten verringert werden kann [133, 134].

Ein weiterer Ansatz zu testen, wie das pankreatische RAS in die Entwicklung und Progression des T2DM involviert ist, wurde von Chu et al. unternommen. Sie konnten zeigen, dass die Expression des AT₁-Rezeptors in einer db/db Mauslinie, die ein Modell für T2DM mit Fettleibigkeit darstellt, hochreguliert ist [131] und entwickelten die Theorie, dass dadurch endogene ANG II Spiegel einen Effekt auf die Inselzellfunktion haben. Gezeigt wurde außerdem, dass bei einer sehr hohen Glukosekonzentration die Glukose-induzierte Insulinsekretion und die (Pro-) Insulin-Biosynthese gehemmt werden. Im selben Mausmodell konnte weiter gezeigt werden, dass durch eine AT₁-Rezeptorblockade durch Losartan über vier Wochen die Expression der NADPH-Oxidase gesenkt wird. Dadurch kommt es zu verminderter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, was zur Folge hatte, dass weniger UCP-2^{XLVI} exprimiert wurde. UCP-2 ist ein negativer Regulator der Insulinsekretion, da es die Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran für Protonen erhöht und dadurch zu einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung führt, was wiederum eine geringe ATP-Produktion bedingt [157]. Deshalb kommt es durch eine UCP-2-Abnahme zu einer verbesserten Insulinsekretion. Des Weiteren kam es zu einem geringeren Verlust an β -Zell-Masse durch Apoptose [158]. Passend zu diesen Ergebnissen konnte mit der Methode einer immunohistochemischen Färbung in OLETF Ratten und db/db Mäusen eine Abnahme der NADPH Oxidase Bestandteile gp91phox und p22phox durch eine vierwöchige Gabe von Valsartan gezeigt

^{XLV} ZDF: Zucker diabetic fatty

^{XLVI} UCP-2: Uncoupling protein-2

werden [159]. Dieses Resultat konnte von Shao et al. durch eine Gabe von Candesartan über sechs Wochen bestätigt und noch um die Erkenntnis erweitert werden, dass durch die geringere Expression von gp91phox und p22phox weniger Marker für oxidativen Stress zu finden sind und dass es zu einem geringeren Ausmaß von intra- und extrainsulärer Fibrose kommt [160]. Unter Berücksichtigung dieser Daten scheint es beim T2DM, wie schon bei der Pankreatitis für den exokrinen Pankreas beschrieben, über den AT₁-Rezeptor vermittelt zu einer weiteren Progression der Krankheit zu kommen. Über den AT₁-Rezeptor kommt es zu einer vermehrten Expression von NADPH-Oxidase und dadurch zu einem erhöhten oxidativen Stress in der Inselzelle. Dieser oxidative Stress und eine erhöhte UCP-2-Expression führen zur Dysfunktion der β -Zelle. Außerdem kommt es zu Apoptose und zu fibrotischem Umbau des endokrinen Pankreas.

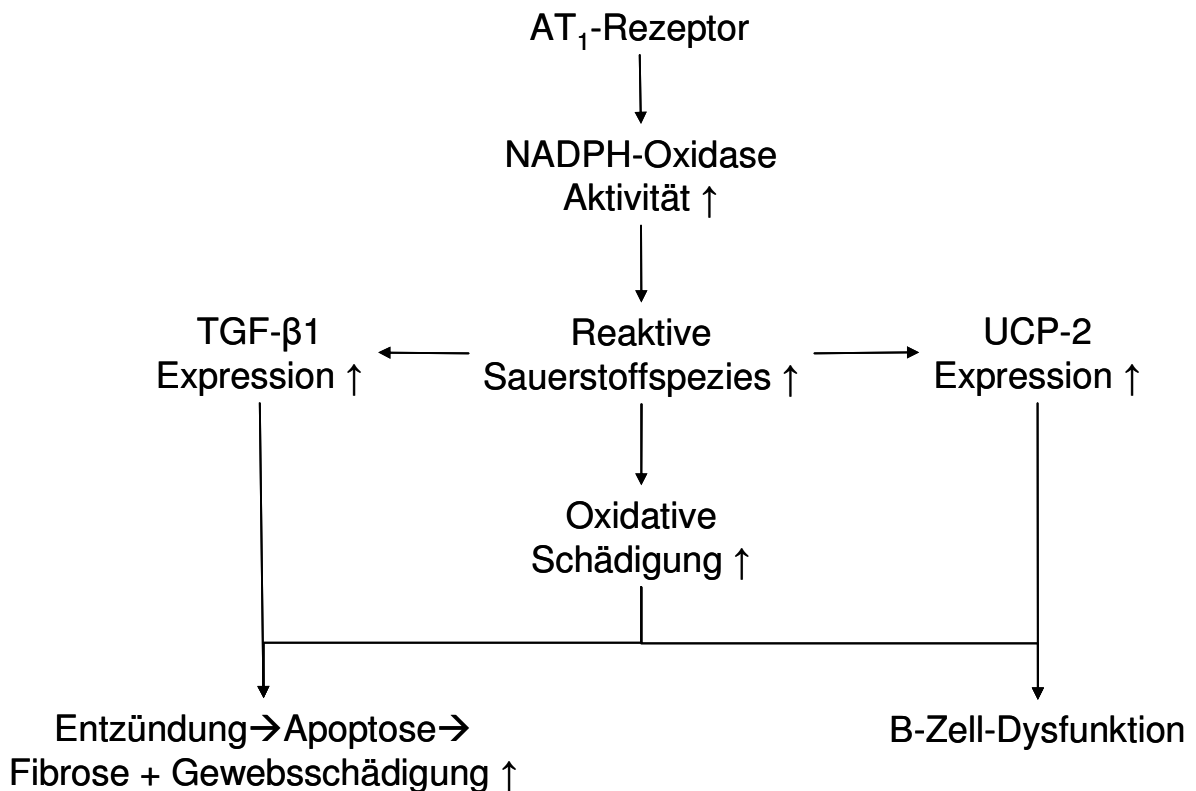


Abbildung 1-7: Auswirkung der Aktivierung des AT₁-Rezeptors bei T2DM im endokrinen Pankreas

Eine gewisse Diskrepanz besteht hingegen bei den Aussagen über die Funktion des RAS bzw. von ANG II im Bezug auf die Insulinsekretion unter nicht pathologischen Bedingungen. An männlichen Sprague Dawley Ratten hatte eine Infusion mit ANG II einen negativen Einfluss auf den Insel- und den Gesamtblutfluss des Pankreas. Der ACE-Inhibitor Enalapril und Sarile, als partieller AT₁-Rezeptorantagonist, hatten vor

allem bezüglich des Inselblutflusses einen gegenteiligen Effekt. Am isolierten, perfundierten Pankreas aus Tieren derselben Rasse hatte ANG II in der Konzentration von 10 ng/ml (~10nM) einen negativen Effekt auf die erste Phase der durch 16,7 mM Glukose induzierten Insulinsekretion. Enalapril konnte die Insulinsekretion nicht beeinflussen. Wurde ANG II aber 20 min vor der Glukosestimulation appliziert, blieb die Injektion ohne Wirkung auf die Insulinsekretion. Deshalb wurde in dieser Studie davon ausgegangen, dass der negative Einfluss von ANG II auf die erste Phase der Insulinsekretion auf den initial verminderten Inselblutfluss zurückzuführen ist [127]. Ein weiterer wichtiger Teilaspekt dieser Studie ist noch, dass ANG II bei Glukosekonzentrationen von 2,8 mM und 5,6 mM die Insulinsekretion steigern konnte.

Die Ergebnisse bezüglich der RAS-Antagonisten konnten durch Huang et al. für Captopril und Irbesartan bestätigt werden. Auch hier wurden der Inselblutfluss und die Insulinsekretion verbessert. Da aber im Gegensatz zur Studie von Carlsson et al. mit Ganztieren und nicht mit perfundiertem Pankreas gearbeitet wurde, wurden die Insulinkonzentration im Serum gemessen und als Unterschied zu der Studie von Carlsson et al. festgestellt, dass hier die Spätphase der Insulinsekretion verbessert wurde [161, 162]. Zusätzlich wurde noch bei weiblichen Wistar Ratten eine verbesserte Glukosetoleranz festgestellt, obwohl bei männlichen Ratten der Blutglukosespiegel ohne vorherige i.p. Injektion von Glukose nicht beeinflusst wurde. Da die aufgeführten Studien *in vivo* oder am perfundierten Organ durchgeführt wurden, kann man nicht sicher sein, ob die erzielten Ergebnisse nicht auf einen Effekt von ANG II auf die pankreatischen Gefäße zurückzuführen sind, wie es auch in der Studie von Carlsson et al. geschlussfolgert wurde. Deshalb wurden Untersuchungen an isolierten Langerhans'schen Inseln durchgeführt. In einem statischen Versuchsystem wurden explantierte Inseln der Maus von Lau et al. über 60 min mit 1,7 mM Glukose inkubiert. Anschließend wurde auf ein Medium, das 16,7 mM Glukose enthielt, gewechselt. Durch diesen Wechsel kam es erwartungsgemäß zu einer Erhöhung der Insulinsekretion. Diese Erhöhung der Insulinsekretion konnte dosisabhängig von ANG II in den Konzentrationen von 0,1-100 nM verringert werden. Eine vorherige Behandlung mit Losartan (1 µM) konnte die Abnahme der Insulinsekretion durch ANG II (100 nM) unterbinden, wohingegen eine vorherige Inkubation mit PD123319 als selektiver AT₂-Rezeptorantagonist keine Änderung hervorrief [130]. Die Änderung der Insulinsekretion durch ANG II war nicht

begründet durch eine verminderte Glukoseoxidation, sondern durch eine verminderte (Pro-)Insulinbiosynthese, wobei auch die Gesamtproteinsynthese tendenziell sank, aber nicht statistisch signifikant verändert war. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Chu et al. in einer Studie, in der Inseln von diabetischen db/db Mäusen im selben Versuchssystem untersucht wurden [131].

Im Gegensatz zu diesen beiden Studien wurde in einer älteren Studie aus dem Jahr 1984 von Dunning et al., in der hauptsächlich die Wirkung von Neuropeptiden auf die Hormonsekretion des Pankreas untersucht wurde, keine Veränderung der Insulinsekretion durch ANG II festgestellt [163]. Für die Untersuchung wurden Langerhans'sche Inseln von männlichen Sprague-Dawley Ratten für eine Stunde mit den Testsubstanzen inkubiert und dann das überstehende Medium mittels RIA auf Insulin oder Glucagon untersucht. Die Inkubation erfolgte mit 2 ng/ml (~2nM) ANG II in einem Medium, das 5,6 mM Glukose enthielt.

In einer weiteren Studie, in der humane Inseln und MIN6 Zellcluster untersucht wurden, konnte in einer veränderten Versuchsanordnung ein zusätzliches Ergebnis beschrieben werden. Die Inseln und die Zellcluster wurden in einer Durchflusszelle mit ANG II oder Hypertensin, einem ANG II Analogon, inkubiert [164]. Die bei diesen Experimenten eingesetzten MIN6 Zellen wurden 1990 zusammen mit einer Schwesterzelllinie MIN7 etabliert, stammen aus einem Insulinom transgener Mäuse und stellen ein Versuchmodell für β -Zellen dar, da sie weiterhin auf einen Glukosestimulus hin Insulin freisetzen [165]. Hypertensin konnte sowohl an MIN6 Zellen als auch an humanen β -Zellen die intrazelluläre Calciumkonzentration dosisabhängig von 1-100 nM erhöhen. Dafür wurden die Zellen mit Fura-2 beladen und der Quotient der Strahlungsemission bei 340 und 380 nm gemessen. Die humanen β -Zellen wurden durch vorherige Antwort auf Tolbutamid, einem Sulfonylharnstoffderivat, das zur Schließung ATP-abhängiger K^+ -Kanäle und damit zur Depolarisation führt, von den restlichen Inselzellen getrennt. Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration konnte durch Inkubation zusammen mit Sarile, aber nicht durch PD123319, verhindert werden. Besonders auffällig war hierbei, dass bei humanen β -Zellen die intrazelluläre Calciumkonzentration bei Inkubation mit 100 nM Hypertensin stärker anstieg als mit 100 μ M Tolbutamid. Außerdem konnte die Hypertensin induzierte, intrazelluläre Calciumkonzentrationserhöhung sowohl durch den Calciumkanalmodulator Nifedipin als auch durch den PLC-Inhibitor U73122 nur teilweise gehemmt werden. Bezüglich der Insulinsekretion hatten ANG II

und Hypertensin einen stimulatorischen Effekt. ANG II (100 nM) konnte bei Glukosekonzentrationen von 2, 8 und 16,7 mM die Insulinsekretion steigern, wobei die Steigerung reversibel war und wieder verschwand, sobald ANG II aus dem Perfusionsmedium entfernt wurde. Auch in den Experimenten zur Insulinsekretion konnte eine Inkubation zusammen mit Nifedipin nur teilweise die gesteigerte Insulinsekretion unterbinden.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die Datenlage über die Beeinflussung der Insulinsekretion durch ANG II weiterer Klärung bedarf.

Tier/Organ/ Zelllinie	System	Agonist	Effekt	Antagonisten	Effekt der Antagonisten	Literatur
Sprague Dawley Ratten	Ganztier	ANG II	Pankreas- und Inselblutfluss ↓	Enalapril/+ Sarile/+	Pankreas- und Inselblutfluss normalisiert	Carlsson et al., 1998
Pankreas aus Sprague Dawley Ratten	Perfundiertes Organ	ANG II	Verspätete Insulinsekretion	Enalapril/- Sarile/+	Frühphase der Insulinsekretion normalisiert	Carlsson et al., 1998
Männliche Wistar Ratten	Ganztier	-		Captopril Irbesartan	Seruminsulin ↑ Blutglukose +/-	Huang et al., 2006
Weibliche Wistar Ratten	Ganztier	-		Captopril Irbesartan	Spätphase der Insulinsekretion ↑ Glukosetoleranz ↑	Huang et al., 2007
Langerhans´sche Inseln von Mäusen	Statische Inkubation	ANG II	Insulinsekretion ↓ (Pro-)Insulinbiosynthese ↓	Losartan	Insulinsekretion ↑ (Pro-)Insulinbiosynthese ↑	Lau et al. 2004
Langerhans´sche Inseln von db/db Mäusen	Statische Inkubation	ANG II	Insulinsekretion ↓ (Pro-)Insulinbiosynthese ↓	Losartan	Insulinsekretion ↑ (Pro-)Insulinbiosynthese ↑	Chu et al. 2006
Langerhans´sche Inseln von Sprague Dawley Ratten	Statische Inkubation	ANG II	Kein Effekt auf die Insulinsekretion			Dunning et al. 1984
Humane β-Zellen MIN6 Zellen	Durchflusskammer	Hypertensin	[Ca ²⁺] _i ↑	Sarile/+ PD123319/- Nifedipin /(+) U73122/(+)	[Ca ²⁺] _i normalisiert	Ramracheya et al. 2006
Humane Langerhans´sche Inseln MIN6 Zellen	Durchflusskammer	ANG II Hypertensin	Insulinsekretion ↑	Sarile/+ Nifedipin /(+)	Insulinsekretion normalisiert	Ramracheya et al. 2006

Tabelle 1-3: Einfluss von ANG II und verschiedener Arzneistoffe/Modellsubstanzen auf die Insulinsekretion und der damit verbundenen Stoffwechselwege

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

ANG II hat neben seinen regulatorischen Funktionen auf den Blutdruck noch viele weitere Aufgaben in diversen Organen. Eines dieser Organe ist das Pankreas; hier hat ANG II sowohl im endokrinen als auch im exokrinen Pankreas verschiedenste Wirkungen. Je nach physiologischer oder pathophysiologischer Stoffwechsellage werden durch ANG II unterschiedlichste Effekte ausgeübt. Unter diese Effekte fällt wie bereits erwähnt auch die Beeinflussung der Insulinsekretion. Aufgrund der sich widersprechenden Informationslage bezüglich der Beeinflussung der Insulinsekretion durch ANG II sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dafür wurden Zellen der Insulinomazelllinie INS-1 verwendet.

Es wurde sich bewusst für eine Zelllinie und nicht für Ganztierexperimente, Organversuche oder Versuche mit Teilen von Organen entschieden, weil der isolierte Effekt auf die Insulinsekretion untersucht werden sollte. Denn selbst bei Untersuchungen an Langerhans'schen Inseln kann vor allem in einem statischen Versuchssystem eine Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Zellen des Inselorgans nicht ausgeschlossen werden genauso wenig wie lokale negative Feedback-Effekte.

Für die Untersuchung über den Einfluss auf die Insulinsekretion von INS-1 Zellen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Gibt es ANG II-Bindungsstellen an INS-1 Zellen?
- Welches sind die Charakteristika dieser Bindungsstellen?
- Kann ANG II über diese Bindungsstellen die Insulinsekretion beeinflussen?
- Welcher ANG II-Rezeptor ist für die Beeinflussung verantwortlich?
- Wie kommt die Beeinflussung der Insulinsekretion zustande?

2 Material

2.1 Zellkultur

Die aufgeführten Zelllinien werden in 75 cm² Zellkulturflaschen in einem Zellkulturschrank bei 35 °C und einem Gasgemisch aus 95 % Luft und 5 % CO₂ kultiviert. Die Passage der verschiedenen Zellen findet aufgrund ihrer heterogenen Wachstumsgeschwindigkeiten zu unterschiedlichen Zeitpunkten, aber immer wenn die Zellen halb konfluent gewachsen sind, statt. Um die Zellen zu passagieren, wird das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung ca. 5 min inkubiert. Nachdem sich die Zellen durch leichtes Aufschlagen der Flasche vom Boden gelöst haben, wird die Reaktion mit kaltem Medium gestoppt und die lebenden Zellen bei 300 x g abzentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in frischem Medium vereinzelt und wieder in 75 cm² Zellkulturflaschen oder 24er Multiwell Platten ausgesät. Bei den INS-1 Zellen wird vorher die Zellzahl noch mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt.

2.1.1 Zelllinien

2.1.1.1 INS-1

Die INS-1 Zelllinie wurde 1992 zusammen mit ihrer Schwesterzelllinie INS-2 etabliert. Hierfür wurden Zellen aus einem durch Röntgenstrahlen induzierten Insulinom einer Ratte isoliert und in Kultur gebracht.

Das Wachstum von INS-1 Zellen ist von dem Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol abhängig, da sein Weglassen in der Zellkultur zu einem rapiden Abfall des zellulären Glutathionspiegels führt.

Trotz ihrer Eigenschaft eine Insulinomazelllinie zu sein, besitzen INS-1 Zellen viele Eigenschaften natürlicher β -Zellen. Sie synthetisieren Proinsulin I und II und reagieren auf einen Glukosestimulus mit Insulinsekretion. Des Weiteren depolarisiert Glukose INS-1 Zellen und führt zu einer Erhöhung des cytosolischen Calciums, was darauf schließen lässt, dass die Mechanismen, die zur Insulinsekretion führen,

dieselben sind wie bei originären β -Zellen. Die Menge des produzierten IRI^{XLVII} entspricht ca. 20 % dessen der nativen β -Zelle.[166]

Die genaue Kultivierung der Zelllinie erfolgt nach etablierten Methoden.[167]

2.1.1.2 3T3-L1

1974 haben Green und Meuth diesen Subklon der 3T3 Mäuse-Fibroblasten-Zelllinie etabliert [168]. Die 3T3-L1 Zellen sind dazu in der Lage durch bestimmte äußere Einflüsse in Adipozyten auszdifferenzieren und Triglyceride in Lipidvakuolen zu akkumulieren. Da sie aber zur Kollagen- und Hyaluronsäuresynthese befähigt sind, sollte sie nicht als Präadipozyten-, sondern eher als eine Fibroblasten-Zelllinie mit besonderen Eigenschaften gesehen werden. Die 3T3-L1 Zellen haben in der Zellkultur eine hohe Teilungsrate, die aber durch Kontaktinhibierung ab einer Zelldichte von ca. 50000Zellen/cm² schnell abnimmt. Neben den 3T3-L1 Zellen gibt es noch weitere Subklone der 3T3-Linie wie z.B. NIH-3T3 und 3T3-F442A. Wobei die letztere ähnliche Eigenschaften wie die 3T3-L1 Zellen besitzt, aber die Differenzierung nicht durch Exogene Reize induziert werden muss, sondern der bloße Zell-Zell-Kontakt genügt, um eine Differenzierung zu starten.

Die Kultivierung und Differenzierung erfolgt nach etablierten Methoden [169].

^{XLVII} IRI: Immunoreaktives Insulin

2.1.2 Chemikalien

	Hersteller	Anmerkung
Dexamethason	Sigma-Aldrich	
DMEM ^{XLVIII} high glucose (4,5 g/l)	PAA Laboratories	
Dulbecco PBS Lösung	PAA Laboratories	Ohne Ca ²⁺ ; Mg ²⁺
Fötales Bovines Serum Gold (FCS ^{XLIX})	PAA Laboratories	Hitzeinaktiviert
HEPES Pufferlösung 1 M	PAA Laboratories	5 ml Aliquots, gelagert bei 4 °C
IBMX ^L	Sigma-Aldrich	gelöst in DMSO ^{LI}
Insulin bovin für Zellkultur	Sigma-Aldrich	10 mg/ml in HEPES 25 mM pH 8,2
L-Glutamin-Lösung 200 mM	PAA Laboratories	5 ml Aliquots, gelagert bei -20 °C
2-Mercaptoethanol	Invitrogen	50 mM, 0,5 ml Aliquots, gelagert bei -20 °C
Neonatales Kälberserum (NCS ^{LII})	PAA Laboratories	Hitzeinaktiviert
Penicillin/ Streptomycin 100 x	PAA Laboratories	5 ml Aliquots, gelagert bei -20 °C
Pyruvat-Na Lösung 100 mM	PAA Laboratories	5 ml Aliquots, gelagert bei 4 °C
RPMI 1640	PAA Laboratories	
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories	5 ml Aliquots 0,25 %, gelagert bei -20 °C

2.1.3 Zellkulturmedien

INS-1 ZELLEN

	Inhaltsstoff	Konzentration
Kulturmedium	RPMI 1640	
	FCS	10 %
	Glutamin	2 mM
	Penicillin	100 I.U./ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	HEPES	10 mM
	Natriumpyruvat	1 mM
	2-Mercaptoethanol	0,5 ml

^{XLVIII} DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

^{XLIX} FCS: fetal calf serum

^L IBMX: 3-Isobutyl-1-methylxanthine

^{LI} DMSO: Dimethylsulfoxid

^{LII} NCS: neonatal calf serum

3T3-L1 ZELLEN

	Inhaltsstoff	Konzentration
Fibroblastenkulturmedium	DMEM high glucose	
	Glutamin	2 mM
	HEPES	10 mM
	Natriumpyruvat	1 mM
	NCS	10 %
	Penicillin	100 I.U./ml
	Streptomycin	100 µg/ml
Adipozytenkulturmedium	DMEM high glucose	
	Glutamin	2 mM
	HEPES	10 mM
	Natriumpyruvat	1 mM
	FCS	10 %
	Penicillin	100 I.U./ml
	Streptomycin	100 µg/ml
Fibroblastendifferenzierungsmedium	Komplettmedium	
	IBMX	0,5 mM
	Dexamethason	0,25 µM
	Insulin	1 µg/ml (ca. 26 IU/ml)
	Das Medium wird lichtgeschützt gelagert und max. 3 Wochen verwendet.	
Adipozytendifferenzierungsmedium	Komplettmedium	
	Insulin	1 µg/ml
Einfriermedium	Fibroblastenkulturmedium	16 ml
	NCS	2 ml
	DMSO	2 ml
	Das Pellet einer Zellkulturflasche wird in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen und eingefroren	

2.1.4 Materialien

	Hersteller	Anmerkung
Kryobehälter	Taylor-Wharton	
Kryogefäße 1,5 ml	Sarstedt	
Kühlzentrifuge CR412	Jouan GmbH	
Kühlzentrifuge Labofuge 400R	Heraeus	
Lichtmikroskop	Krüss GmbH	
Multiwell Platten 24er	Nunc	Nunclon ® , farblos
Pipettierhilfe swiftpet	Abimed	
Proben-Einfriercontainer	National Lab	
Probenröhrchen 15 ml	Sarstedt	
Probenröhrchen 50 ml	Greiner	
sterile Werkbank	Antair BSK	
Sterilfilter PTFE	Millipore	für aggressive Lösungen (DMSO)
Wasserbad SW-20C	Jalabo	
Zellkulturflaschen	Sarstedt	
Zellkulturschrank HeraCell 240	Kendro-Heraeus	
Zellkulturschrank IG 150	Jouan GmbH	

2.2 1D-SDS-PAGE/Western Blot

2.2.1 Chemikalien

	Hersteller
Acrylamid/bis Acrylamid 40 %	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat	Fluka
Anti-AT ₁ -Antikörper sc1173	Santa Cruz Biotechnology
Anti-rabbit-Antikörper	Sigma
Bromphenolblau	Bio-Rad
EDTA	Merck
EGTA	Boehringer Mannheim
Glycerol 87 %	Fluka
Glycin	Riedel-de-Haën
KCl	J. T. Baker B. V.
KH ₂ PO ₄	Merck
ECL ^{LIII} -Reagenz Immobilon® Western	Millipore
Magermilchpulver	Fluka
Methanol	J. T. Baker B. V.
NaCl	Merck
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	Merck
SDS	Sigma
TEMED	Merck
Tris	AppliChem
Tween 20	Fluka

2.2.2 Puffer und Stammlösungen

ANODENPUFFER 10X

	Menge	Konzentration
Tris	30,30 g	250 mM
In 800 ml ddH ₂ O lösen, auf pH 7,4 einstellen und auf 1000 ml verdünnen. In situ 1/10 verdünnen.		

^{LIII} ECL: enhanced chemoluminescence

BLOTTINGPUFFER

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
Glycin	2,9 g	39 mM
Methanol	200 ml	20 %
SDS	0,0375	0,0375 %
Tris	5,8 g	48 mM
mit ddH ₂ O auf 1000 ml auffüllen.		

HOMOGENISTATIONSPUFFER 10X

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
EDTA	0,37 g	10 mM
EGTA	0,38 g	10 mM
Tris	2,42 g	200 mM
In 80 ml ddH ₂ O lösen, auf pH 7,4 einstellen und auf 100 ml verdünnen. In situ 1/10 verdünnen und 10 ml mit einer Tablette complete mini versetzen		

KATHODENPUFFER 10 X

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
Glycin	144,14 g	1920 mM
SDS	1,00 g	0,1 %
Tris	30,30 g	250 mM
In 1000 ml ddH ₂ O lösen. In situ 1/10 verdünnen		

PBS-PUFFER

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
KCl	0,20 g	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,27 g	2,0 mM
NaCl	8,00 g	137,0 mM
Na ₂ HPO ₄ (x 12H ₂ O)	1,42 g (3,58 g)	10,0 mM
In 800 ml ddH ₂ O lösen, auf pH 7,4 einstellen, auf 1000 ml verdünnen und autoklavieren.		

LYSEPUFFER

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
EDTA	0,037 g	1,0 mM
NaCl	0,292 g	0,5 mM
Tris	0,292 g	20,0 mM
Triton X	1,000 g	1 %
In 80 ml ddH ₂ O lösen, auf pH 7,4 einstellen, auf 100 ml verdünnen.		

PBST^{LIV}-PUFFER 10X

	Menge	Konzentration
KCl	2,0 g	27 mM
KH ₂ PO ₄	2,7 g	20 mM
NaCl	80,0 g	1370 mM
Na ₂ HPO ₄ (x 12H ₂ O)	14,2 g (35,8 g)	100 mM
Tween 20	6,0 g	0,6 %
In 800 ml ddH ₂ O lösen, auf pH 7,4 einstellen, auf 1000 ml verdünnen und autoklavieren. Anschließend Tween dazugeben und evtl. Verdunstungsverlust auffüllen.		

PROBENPUFFER 2X

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
Bromphenolblau	20,0 mg	0,02 %
EDTA	74,0 mg	2 mM
Glycerol 87 %	20,0 g	20 %
SDS	4,0 g	4 %
Tris	3,0 g	250 mM
in 50 ml ddH ₂ O lösen und pH auf 6,8 einstellen und auf 100 ml auffüllen.		

SAMMELGELPUFFER 2X

	Menge	Konzentration
SDS	0,2 g	0,2 %
Tris	3,0 g	250 mM
in 50 ml ddH ₂ O lösen und pH auf 6,8 einstellen und auf 100 ml auffüllen		

TRENNGELPUFFER 3X

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
SDS	0,3 g	0,3 %
Tris	13,6 g	1125 mM
in 50 ml ddH ₂ O lösen und pH auf 8,8 einstellen und auf 100 ml auffüllen		

^{LIV} PBST: Phosphate buffered saline with Tween

2.2.3**Material**

	Hersteller
Blottingkammer Trans-Blot® SD	Bio-Rad
Blottingpapier	Schleicher und Schüll
Celloshaker Variospeed	Chemtron
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll
Röntgenfilm	Amersham
Spannungsgerät	H. Hölzel
Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultraschalldesintegrator Soniprep 150	MSE
Zellspachtel	TPP
Ultrazentrifuge L8-70M	Beckman
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus

2.3 Bindungsstudien

2.3.1 Chemikalien

	Hersteller
Angiotensin II	Bachem
¹²⁵ I-Angiotensin II	Biotrend
NaCl	J. T. Baker B.V.
KCl	J. T. Baker B.V.
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck
HEPES	AppliChem
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck
BSA	Biomol

2.3.2 Puffer und Stammlösungen

INKUBATIONSPUFFER 5 X

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
NaCl	39,42 g	1350 mM
KCl	1,86 g	50 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,02 g	20 mM
HEPES	11,92 g	100 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,735 g	1 mM
Aqua demineralisata	ad 500,0 ml	
Der Stammpuffer wird kühl gelagert, in situ 1/5 verdünnt und mit 1 % BSA versetzt.		

2.3.3 Material

	Hersteller
γ-Counter LB 2111	Berthold
Membranpumpe	Vacuubrand + CO
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
PCR-Röhrchen	Biozym
Zellspachtel	TPP
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf

2.4 Insulinsekretion

2.4.1 Chemikalien

	Hersteller
Angiotensin II	Bachem
BSA ^{LV}	Biomol
CaCl ₂ *2H ₂ O	Merck
Glibenclamid	Sigma
D-(+)-Glukose wasserfrei	Merck
HEPES	AppliChem
KCl	J. T. Baker B. V.
KH ₂ PO ₄	Merck
Losartan	MSD
MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck
NaCl	J. T. Baker B. V.
Sarile	Bachem

2.4.2 Puffer und Stammlösungen

KRH^{LVI}-PUFFER

Lösung A	1 Teil
Lösung B	1 Teil
Lösung C	1 Teil
Aqua demineralisata	7 Teile
Vor Gebrauch mit 0,5 % BSA versetzen und auf pH 7,35 einstellen.	

LÖSUNG A

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
NaCl	69,2 g	1184,12 mM
KCl	3,61 g	48,42 mM
KH ₂ PO ₄	1,62 g	11,90 mM
MgSO ₄ *7H ₂ O	2,93 g	11,89 mM
Aqua demineralisata	ad 1000 ml	

^{LV} BSA: Bovines Serumalbumin
^{LVI} KRH: Krebs-Ringer-HEPES

LÖSUNG B

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
CaCl ₂ *2H ₂ O	3,73 g	25,37 mM
Aqua demineralisata	ad 1000 ml	

LÖSUNG C

	Menge	Konzentration
HEPES	23,83 g	10,0 mM
Aqua demineralisata	ad 1000 ml	

Der KRH-Puffer wird für jeden Versuchstag frisch hergestellt, da sonst bei längerer Lagerung CaSO₄ ausfallen würde

GLUKOSE-STAMMLÖSUNG

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
Glukose wasserfrei	5 g	560 mM
Aqua demineralisata	ad 50 ml	

2.4.3 **Material**

	Hersteller
Multiwell Platten 24er	Nunc
Elektrapette Impact ² ®	Matrix

2.5 Radio-Immuno-Assay

2.5.1 Chemikalien

	Hersteller
Antikörper I	Biotrend
Antikörper II	Linco
BSA	Biomol
CaCl ₂ *2H ₂ O	Merck
Carrier	Linco
EDTA (Titriplex)	Merck
EMTSA (Thiomersal)	Caelo
HEPES	AppliChem
IRI-Standard-Insulin	
¹²⁵ I-Insulin	Hoechst
KCl	J. T. Baker B. V.
KH ₂ PO ₄	Merck
MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck
Na-Azid	J. T. Baker B. V.
NaCl	J. T. Baker B. V.
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	Merck

2.5.2 Puffer und Stammlösungen

ANTIKÖRPER I-STOCK-SOLUTION

Der Antikörper I wird in 50 µl Vials geliefert und muss erst mit 1 ml Assay-Puffer verdünnt werden. Diese Verdünnung wird aliquotiert und eingefroren. Für den RIA sind dann entsprechend viele Aliquots aufzutauen und übrig gebliebener AK I wieder einzufrieren.

ANTIKÖRPER I-WORKING-SOLUTION

Für die Antikörper I-working-solution wird die stock-solution 1:100 in Assay-Puffer verdünnt.

ASSAY/WASCH-PUFFER

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
EDTA (Titriplex)	9,30 g	24,98 mM
EMTSA (Thiomersal)	0,10 g	0,25 mM
KH ₂ PO ₄	0,65 g	4,78 mM
NaCl	9,00 g	154,00 mM
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	16,50 g	46,07 mM
Aqua demineralisata	ad 1000 ml	
Vor Gebrauch als Assay-Puffer mit 1 % BSA versetzen und auf pH 7,4 einstellen. Bei Gebrauch als Wasch-Puffer nur den pH einstellen.		

CARRIER-WORKING-SOLUTION

Der Carrier, der in 2 ml Vials geliefert wird, muss mit 6 ml Assay-Puffer verdünnt werden. Diese Verdünnung wird aliquotiert und eingefroren. Für den RIA sind dann entsprechend viele Aliquots aufzutauen und übrig gebliebener Carrier wieder einzufrieren.

KRH-PUFFER/ISOTOPENPUFFER

Die Herstellung des KRH-Puffers wurde schon für die Sekretionsversuche beschrieben. Für die Verwendung als Isotopenpuffer wird der KRH-Puffer zusätzlich mit 0,1 % Na-Azid versetzt.

2.5.3 Material

	Hersteller
γ-Counter LB 2111	Berthold
Kühlzentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus
Multipette	Eppendorf
RIA-Röhrchen 4,5 ml	Sarstedt
Verdünnungsgerät Microlab® 500 series	Hamilton

2.6 ⁴⁵Calciumaufnahme

2.6.1 Chemikalien

	Hersteller
Angiotensin II	Bachem
BSA	Biomol
⁴⁵ CaCl	GE healthcare
CaCl ₂ *2H ₂ O	Merck
D-(+)-Glukose wasserfrei	Merck
HEPES	AppliChem
KCl	J. T. Baker B. V.
KH ₂ PO ₄	Merck
MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck
SDS	Sigma
NaCl	J. T. Baker B. V.
Szintillationscocktail	Zinsser Analytik

2.6.2 Puffer und Stammlösungen

Die Herstellung von KRH-Puffer und Glukosestammlösung wurde schon für die Sekretionsversuche beschrieben.

SDS-PUFFER

Inhaltsstoff	Menge	Konzentration
SDS	0,5 g	0,1 %
Aqua demineralisata	ad 50 ml	

2.6.3 Material

	Hersteller
β-Counter LS 600 LL	Beckman
Membranpumpe	Vacuubrand + CO
Szintillationsgefäße Mini 2000	Zinsser Analytik
Multiwell Platten 24er	Nunc

3 Methoden

3.1 1D-SDS-PAGE/Western Blot

3.1.1 Probengewinnung

INS-1 ZELLEN

Für die Probengewinnung werden zwei 75 cm² Zellkulturflaschen benötigt. Diese werden jeweils zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS-Puffer gespült. Anschließend werden die Zellen, nachdem 5 ml eiskalter PBS-Puffer vorgelegt wurde, mit einem Zellschaber mechanisch vom Zellkulturflaschenboden abgelöst und die abgeschabten Zellen samt Puffer in ein 50 ml Röhrchen überführt. Dieser Vorgang wird ein zweites Mal wiederholt, um eine möglichst vollständige Ablösung der Zellen zu gewährleisten. Die vereinigten Zellsuspensionen werden dann 5 min bei 300 x g zentrifugiert, um die beim Abschaben zerstörten von den intakten Zellen zu trennen. Nach der Zentrifugation wird das erhaltene Pellet nochmals in 5 ml PBS-Puffer resuspendiert und wieder zentrifugiert. Das Pellet wird dann in 3 ml Homogenisationspuffer aufgenommen und die Zellen 3 x 10 s im Soniprep unter Eiskühlung zerstört. Das so erhaltene Zellhomogenat wird 10 min bei 5000 x g zentrifugiert, um nicht lösliche Bestandteile (z.B.: große Membranfragmente, Mitochondrien, etc.) abzutrennen. Danach wird der Überstand eine Stunde bei 33000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das aus diesem Zentrifugationsschritt hervorgehende Pellet wird in Lysepuffer solubilisiert und die erhaltene Lösung eingefroren oder direkt mit 2 x Probenpuffer versetzt.

3T3-L1 ZELLEN

Die 3T3-L1 Zellen werden wie die INS-1 Zellen aufgearbeitet. Als Unterschied zu den INS-1 Zellen wird aber nur eine Zellkulturflasche geerntet und nach Beginn der Induktion der Differenzierung werden die Zellen mit 4000 x g zentrifugiert, um sicherzustellen, dass auch die Adipozyten mit abzentrifugiert werden. Dass dann auch tote Zellen mit abzentrifugiert werden, muss dabei in Kauf genommen werden.

REFERENZGEWEBE (NIERE, LEBER)

Die Organe, die für die Gewinnung der Referenzgewebe dienten, wurden weiblichen Wistar Ratten entnommen.

Die Aufarbeitung der Referenzgewebe ist gleich dem Schema für die INS-1 Zellen. Nur dass nicht zwei Kulturflaschen geerntet werden, sondern ein von der Größe mit dem ersten Pellet der INS-1 Zellaufarbeitung vergleichbares Stück Organ im Dounce-Homogenisator mit 2 ml Homogenisationspuffer zerkleinert wird. Dieses Homogenat wird dann in ein 50 ml Röhrchen überführt und der Dounce-Homogenisator nochmals mit 1 ml Homogenisationspuffer ausgespült. Die vereinigten Suspensionen werden dann weiter mit dem Soniprep zerstört.

3.1.2 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese sollen die Membranproteine der aufgearbeiteten Zellen nach Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dafür wird die diskontinuierliche eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Laemmli [170] verwendet, bei der einem engporigen Trenngel ein grobporiges Sammelgel aufgelagert ist.

Damit das Gel bei der Elektrophorese als Molekularsieb wirken kann, müssen die Proteine mit dem anionischen Detergens SDS und einem Disulfidbrücken-spaltenden Thiolreagenzien wie Dithiothreitol behandelt werden. So wird erreicht, dass die Proteine im elektrischen Feld in Richtung der Anode wandern und nur aufgrund ihres Gewichtes getrennt werden, da durch das Anlagern des SDS die Nettoladung proportional zum Molekulargewicht ist.

Vor Beginn der Elektrophorese werden die Proben 1: 1 mit 2 x Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95 °C erhitzt, um Disulfidbrücken zu spalten und die Proteine zu denaturieren. Danach werden die Proben auf Eis abgeschreckt und dann 3 min bei 2500 x g zentrifugiert, um beim Denaturieren eventuell entstandene Präzipitate abzutrennen. Anschließend werden die Proben in die Taschen des 4 %igen Sammelgels gegeben und die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 20 mA gestartet. Nachdem die Proben im Sammelgel fokussiert wurden und in das Trenngel übergetreten sind, wird die Stromstärke auf 15 mA reduziert. Dies wird gemacht um einen smiling-Effekt zu verhindern, denn obwohl die Elektrophorese im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt wird, würden sich sonst die Proben in der Mitte des Gels, bedingt

durch den Temperaturanstieg, der durch den größeren elektrischen Widerstand herrührt, schneller bewegen als außen. Die auf diese Weise durchgeführte Elektrophorese dauert ungefähr fünf Stunden.

Bei der SDS-PAGE, die mit 3T3-L1 Zellen durchgeführt wurde, wurden die Proteine mit 25 mA fokussiert und dann bei 20 mA aufgetrennt.

3.1.3 Western Blot

Beim Western Blot werden die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, um bessere Verfügbarkeit für spezifische Reaktionen wie der Detektion mit Antikörpern (s.u.) zu erreichen.

Der Name des Western Blots wurde von W.N. Burnette [171] erstmals benutzt und leitet sich vom Southern Blotting einem Auftrennen von DNA-Fragmenten mit anschließender Hybridisierung ab, das von Edwin Southern erfunden wurde.

Das hier angewendete Verfahren ist ein Semidry-Blotting. Dazu wird ein Blottingsandwich aus (von unten nach oben) Anode, Blottingpaper, Nitrocellulosemembran, Polyacrylamidgel, Blottingpaper und Kathode aufgebaut. Die Proteine werden mittels Elektrophorese mit einer Stromstärke von $3 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ für 30 min aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran übertragen.

3.1.4 Detektion

Die Detektion der Rezeptoren erfolgt mit Hilfe einer Doppelantikörpermethode, wobei der Primärantikörper ein monoklonaler Antikörper ist, der spezifisch nur an den gesuchten Rezeptor bindet, und der Sekundärantikörper ein polyklonaler Antikörper ist, der gegen die Spezies gerichtet ist, in der der Primärantikörper gebildet wurde. Des Weiteren ist der Sekundärantikörper noch an HRP^{LVII} gekoppelt, welche das Reagenz Luminol spaltet. Durch diese Reaktion Licht wird emittiert, wodurch dann einen Röntgenfilm geschwärzt wird.

Für die Detektion wird die geblottete Membran über Nacht in PBST mit 5 % Magermilchpulver unter Schütteln inkubiert, um mittels Tween und den Proteinen aus der Magermilch die nicht belegten Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran zu

^{LVII} HRP: horseradish peroxidase

blockieren. Am nächsten Tag wird die Membran dreimal mit 10 ml PBST für 10 min gespült und anschließend für 60 min mit 5 ml des Primärantikörpers in der Verdünnung 1: 200 in PBST mit 2 % Magermilchpulver inkubiert. Nach der ersten Antikörperinkubation wird wieder dreimal gespült und dann wieder 60 min mit 10 ml des Sekundärantikörpers in PBST mit 2 % Magermilchpulver inkubiert. Durch einen weiteren Spülschritt wird überschüssiger Sekundärantikörper entfernt. Die Membran wird dann in der Dunkelkammer für eine Minute mit ECL-Reagenz inkubiert und mit Folie auf einem Trägerbrett wasserdicht fixiert. Die so präparierte Membran belichtet dann in einer Fotokassette einen Röntgenfilmstreifen für 20 min. Nach der Belichtung wird der Röntgenfilm eine Minute lang entwickelt. Die Entwicklung wird durch Tauchen in ein Wasserbad gestoppt. Anschließend wird der Film noch eine Minute lang fixiert, was wiederum durch ein Wasserbad abgebrochen wird. Der Film wird anschließend getrocknet und mit Hilfe der Marker und deren R_f -Werte ausgewertet.

3.2 Rezeptorbindungsstudien

Rezeptorbindungsstudien dienen zur Charakterisierung membranständiger Rezeptoren. Dies kann mit Hilfe zwei verschiedener Methoden erreicht werden. Zum einen besteht die Möglichkeit Sättigungsexperimente durchzuführen. Hierbei werden Zellen oder Membranfragmente mit einer steigenden Konzentration an radioaktivem Liganden inkubiert. Diese Methode eignet sich aber nur für Rezeptoren mit einer sehr hohen Affinität, da sonst sehr große Mengen an Radioaktivität nötig sind. Eine weitere Möglichkeit indirekt auf die Eigenschaften von Rezeptoren zu schließen, sind Verdrängungsexperimente. Dafür wird mit einer konstanten Menge an Radioaktivität gearbeitet, die dann mittels unmarkiertem Liganden aus seiner Bindung am Rezeptor verdrängt wird.

3.2.1 Bindungskinetik

Vor der Durchführung der Verdrängungsexperimente müssen erst Versuche zur Bestimmung der Bindungskinetik des ^{125}I -markierten ANG II gemacht werden, um festzustellen, wann die Bindung am Rezeptor maximal ist. Dafür werden zwei 75 cm² Zellkulturflaschen zweimal mit 10 ml eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen. Danach werden die Zellen zweimal in 10 ml eiskaltem Inkubationspuffer mit einem Zellspachtel abgeschabt. Die vereinigten Zellsuspensionen werden anschließend 5 min bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert, um intakte und durch das Abschaben zerstörte Zellen voneinander zu trennen. Das erhaltene Pellet wird nochmals in 10 ml Inkubationspuffer resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wird abgesaugt und das Pellet bis zum Versuchsbeginn auf Eis gelagert. Das Pellet wird für den Versuch in 2 ml Inkubationspuffer resuspendiert und von dieser Suspension werden 100 µl pro Ansatz in die entsprechende Anzahl an PCR-Röhrchen pipettiert. Nach drei minütigem Temperaturangleich wird zur Bestimmung der Gesamtbindung zu den verschiedenen Zeitpunkten 50 µl Inkubationspuffer und 50 µl radioaktiv markierter Ligand pipettiert. Um das NSB^{LVIII} zu ermitteln, werden 50 µl radioaktiv markierter Ligand und 50 µl unmarkierter

^{LVIII} NSB: nonspecific binding

Ligand, der mindestens 1000-fach höher konzentriert ist, zur Zellsuspension pipettiert. Die PCR-Röhrchen befinden sich während des Versuchs in einem Thermoblock, der auf 25 °C temperiert ist und die Proben mit 800 U/min schüttelt, um zum einen Temperaturschwankungen beim Versuch zu vermeiden und zum anderen um eine möglichst gute Durchmischung zu gewährleisten. Um die Reaktion zu einem bestimmten Zeitpunkt zu stoppen, werden die PCR-Röhrchen 5 min im Eiswasserbad heruntergekühlt und dann 3 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird mit Hilfe einer Pasteurpipette und einer Membranpumpe abgesaugt und die Proben anschließend im γ -Counter vermessen. Nach der Messung werden die Proben mit 200 μ l eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen, wieder abgesaugt und erneut vermessen, bis die gemessene Radioaktivität nicht mehr abnimmt. Zu jedem Versuch werden zusätzlich noch zwei PCR-Röhrchen mit 50 μ l der eingesetzten Radioaktivität vermessen, um die gebundene Radioaktivität auf diese beziehen zu können.

3.2.2 Verdrängungsversuche

SUSPENSIONSMETHODE

Die Suspensionsmethode verläuft, was den Versuchsablauf betrifft, genau wie die Kinetikversuche, nur wird die Reaktion nicht zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt, sondern zu dem Zeitpunkt, der sich bei den Kinetikversuchen als der herausgestellt hat, bei dem die spezifische Bindung am größten ist. Für die Verdrängung durch den unmarkierten Liganden wird dem Versuchsansatz aus 100 μ l Zellsuspension und 50 μ l radioaktivem Ligand noch 50 μ l kalter Ligand in aufsteigender Konzentration zugesetzt.

LYSEMETHODE

Die Lysemethode wurde für den Vergleich mit 3T3-L1 Adipozyten gewählt, da Adipozyten bei der Suspensionsmethode aufschwimmen und sich nicht abzentrifugieren lassen würden.

Hierfür werden 3T3-L1 Fibroblasten in 24er Multiwell Platten ausgesät und auf bekannte Weise zu Adipozyten ausdifferenziert [169]. Da die Standardisierung hier nicht über die Zellkonzentration in der Zellsuspension erfolgen kann, muss über dies Wachstumsfläche geschehen. Das ist möglich, da konfluent gewachsene Zellen das

Wachstum einstellen. Für den Versuch wird das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 1 ml eiskaltem Inkubationspuffer gewaschen. Danach werden sie mit 500 μ l Inkubationspuffer überschichtet und bis zum Versuch auf Eis gelagert. Analog zur Suspensionsmethode werden die Zellen mit 50 μ l radioaktivem Ligand und 50 μ l nichtmarkiertem Ligand versetzt. Zusätzlich werden noch 100 μ l Inkubationspuffer zupipettiert, um wieder auf ein Gesamtkubationsvolumen von 200 μ l zu kommen. Um die Reaktion zu stoppen, wird die 24er Multiwell Platte 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und die Zellen noch zweimal mit 200 μ l eiskaltem Inkubationspuffer gespült. Danach werden die Zellen mindestens 30 min mit einer 0,5 %igen SDS-Lösung lysiert. Das Lysat wird in 4,5 ml RIA-Röhrchen überführt, jedes Well noch mit 200 μ l SDS-Lösung nachgespült und die vereinigten Lösungen samt der Pipettenspitze im γ -Counter vermessen.

AUSWERTUNG

Die graphische Auswertung der Ergebnisse der Verdrängungsversuche wurde mit dem Programm SigmaPlot® durchgeführt. Mit Hilfe des Programms wurden die Verdrängungskurven gefittet und die K_D - und R^2 -Werte errechnet.

3.3 Insulinsekretion

Für die Insulinsekretionsversuche werden INS-1 Zellen in 24er Multiwell-Platten mit der Konzentration $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well ausgesät und fünf bis sechs Tage bis zur Konfluenz wachsen gelassen.

Zu Versuchsbeginn werden die Zellen in ein Eis-Wasser-Bad gestellt, um bei den Wasch und Pipettierschritten kaum Insulinsekretion zu haben.

Die Zellen werden dreimal mit 500 μ l eiskaltem KRH-Puffer gewaschen. Anschließend werden 270 μ l Glukoselösung verschiedener Konzentration zugegeben, um danach mit 30 μ l ANG II Lösung bestimmter Konzentration auf ein Inkubationsvolumen von 300 μ l aufzufüllen, sodass sich eine Konzentration von 3,0, 5,6 bzw. 16,7 mM Glukose ergibt. Die so präparierte Zellkulturplatte wird dann 90 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Wenn zusätzlich zur ANG II Wirkung noch die des AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan getestet wird, werden nur 240 μ l Glukoselösung vorgelegt und dann sowohl 30 μ l Antagonist als auch ANG II-Lösung zu einem Gesamtvolumen von 300 μ l zugegeben. Dabei ist zu beachten, dass ANG II und Losartan nicht gleichzeitig auf die Zellen gegeben werden, sondern die Zellen erst 30 min mit Losartan vorinkubiert werden.

Um bei jedem Versuch die Plausibilität der glukoseinduzierten Insulinsekretion zu testen, werden je zwei Wells nur mit 3,0 mM Glukose, was der Basalsekretion von Insulin entspricht, und zwei mit 5,6 mM Glukose und Glibenclamid in der Konzentration von 1 μ g/ml als Positivkontrolle mit inkubiert.

Nach der Inkubationszeit werden die Zellen wieder in das Eis-Wasser-Bad gestellt, um die Sekretion zu stoppen. Dann werden 150 μ l Aliquots des Überstands entnommen und bei -20 °C eingefroren, um später die Konzentration des kumulativ in den Überstand abgegebenen Insulins im RIA bestimmen zu können.

3.4 Radioimmunoassay

Der Radio-Immuno-Assay ist eine auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion basierende Messmethode, bei der es zu einer Präzipitation oder Agglutination kommt. Hierbei konkurrieren eine nicht radioaktive Substanz und eine radioaktive oder radioaktiv markierte Substanz um die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers. Nach erfolgter Antigen-Antikörper-Reaktion liegen nun die zu untersuchende und auch die radioaktive Substanz in freier und an den Antikörper gebundener Form vor. Um die gebundene und die ungebundene Fraktion von einander zu trennen, gibt es zahlreiche Möglichkeiten, von denen sich die Doppelantikörpermethode und die Methode mit dextranbeschichteter Aktivkohle durchgesetzt haben [172]. Bei der auch hier eingesetzten Doppelantikörpermethode ist noch zu unterscheiden, ob der Komplex aus Antigen, primärem und sekundärem Antikörper mit Hilfe eines Carriers, der die Löslichkeit des Komplexes herabsetzt, oder durch einen sekundären Antikörper, der an ein Makromolekül, z.B. Polyethylenglykol, gekoppelt ist, ausgefällt wird.

3.4.1 Tag 1

Für den Radio-Immuno-Assay werden die bei -20 °C gelagerten Proben aus den Insulinsekretionsversuchen langsam im Kühlschrank aufgetaut und anschließend auf einem Vortex gemischt.

Da die Proben aus den Sekretionsversuchen einen zu hohen Gehalt an Insulin aufweisen, werden sie mit dem Microlab® 500 1: 20 in KRH-Puffer verdünnt.

Von der so erhaltenen Verdünnung werden 10 µl im RIA eingesetzt. Hierzu werden mit Hilfe des Microlab® 500 10 µl Verdünnung und 190 µl Assay-Puffer in 4,5 ml RIA-Röhrchen, die in einem Eis-Wasser-Bad stehen, vorgelegt. Zu diesen 200 µl werden 100 µl ¹²⁵I-Insulin working-solution und 100 µl Antikörper I working-solution nacheinander pipettiert und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert.

Da Antigen-Antikörper-Reaktionen stark vom pH-Wert und anderen Versuchsbedingungen abhängig sind, muss mit jedem neuen RIA eine neue Standardreihe vermessen werden. Dafür werden IRI-Verdünnungen von 0,78-25 µU

eingesetzt, die aliquotiert bei -20 °C gelagert und für jeden Versuch aufgetaut werden.

3.4.2 **Tag 2**

Die Proben werden mit 1000 µl Antikörper II und 10 µl Carrier-working-solution versetzt und für 2-3 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Proben mit 1000 µl Waschpuffer versetzt, um die Konzentration an Radioaktivität im Versuchsröhrchen größtmöglich zu verdünnen. In der sich anschließenden Zentrifugation bei 4 °C und 3500 U/min wird der Komplex aus Insulin und den beiden Antikörpern abgetrennt und die überstehende Lösung dann vorsichtig, aber möglichst vollständig, abdekantiert. Noch im Röhrchen zurückbleibende Flüssigkeit und damit auch nicht abdekantierte Radioaktivität fällt durch den Verdünnungsschritt mit Waschpuffer gegenüber der Radioaktivität des Pellets nicht ins Gewicht.

Die Röhrchen mit den Pellets werden nach dem Abdekantieren im γ -Counter vermessen.

3.5 ⁴⁵Calciumaufnahme

Die Insulinsekretion der β -Zelle ist ein aktiver Prozess für den Ca^{2+} benötigt wird. Bei der physiologischen Insulinsekretion wird Glukose über GLUT 2 Transporter in die Zelle transportiert. Durch das Mehrangebot an Glukose steigt der oxidative Abbau von Glukose in der Zelle und dadurch die ATP-Produktion. Die erhöhte Konzentration von ATP schließt ATP-abhängige Kaliumkanäle. Dadurch verbleibt mehr Kalium in der Zelle und es kommt zu einer Depolarisation. Dies führt dazu, dass sich spannungsabhängige Calciumkanäle öffnen, Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmt und für die Exozytose der Insulingranula zur Verfügung steht. Durch das Radionuklid ⁴⁵Calcium kann nun gezeigt werden, ob ein Stoff, der die Insulinsekretion beeinflusst, dies durch eine Mehraufnahme von Ca^{2+} in die Zelle bewirkt.

3.5.1 Durchführung

Für die Versuche der Calciumaufnahme werden INS-1 Zellen wie für die Insulinsekretion in 24er Multiwell-Platten ausgesät.

Zu Beginn des Versuchs werden die Zellen zweimal mit 500 μl eiskaltem KRH-Puffer gewaschen und anschließend für 20 min mit 200 μl 3,0 mM Glukoselösung im Brutschrank inkubiert, um die Insulinsekretion und damit die Calciumaufnahme auf Basalniveau zu senken. Nach der Inkubation wird die Glukoselösung wieder abgesaugt und die Zellen noch zweimal mit 500 μl eiskaltem KRH-Puffer gewaschen, um eventuell durch das Pipettieren abgelöste Zellen zu entfernen.

Für den eigentlichen Aufnahmeversuch werden die Zellen nun 2,5 bzw. 5 min mit 250 μl einer 5,6 mM Glukoselösung inkubiert, die zusätzlich noch ANG II in verschiedenen Konzentrationen und 0,95 μCi ⁴⁵ Ca^{2+} enthält. Als Positivkontrolle wird hier, wie auch schon bei den Insulinsekretionsversuchen beschrieben, Glibenclamid eingesetzt. Nach der Inkubationszeit werden 125 μl des Überstandes entnommen, in ein Szintillationsgefäß gegeben und der Rest abgesaugt. Es werden nur 125 μl entnommen, um sicher zu gehen, dass durch das Abnehmen eines Aliquots des Überstandes der Zellrasen nicht beschädigt oder mit aufgesaugt wird. Dies würde im Unterschied zum Insulinsekretionsversuch nicht die Ergebnisse des Überstandes,

sondern die der aufgenommenen Menge an $^{45}\text{Ca}^{2+}$ verfälschen. Nachdem der restliche Überstand abgesaugt ist, werden die Zellen mit 200 μl SDS-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur lysiert. Auch die lysierten Zellen werden in ein Szintillationsgefäße überführt, und um sicherzugehen, dass alle Radioaktivität in die Messung mit eingeht, wird das Well noch zweimal mit 200 μl SDS-Puffer ausgespült und die Spüllösungen zu den lysierten Zellen pipettiert. Anschließend wird sowohl der Überstand als auch die lysierten Zellen mit 5 ml Szintillationslösung versetzt und für 24 h inkubiert, um sicherzustellen, dass die zähflüssige organische Szintillationslösung mit den wässrigen Lösungen eine klare Lösung ergibt, da es sonst zu Verfälschungen bei der Szintillationsmessung kommt. Am nächsten Tag werden die Proben dann im β -Counter vermessen. Durch die Messergebnisse der lysierten Zellen und des Überstandes kann dann die relative Menge an aufgenommenem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ berechnet werden.

3.5.2 Kinetik

Die Durchführung der Kinetikversuche entspricht, was die zugesetzte Menge an Radioaktivität und die übrige Handhabung angeht, den normalen Aufnahmeversuchen. Nur wird nicht ANG II bei verschiedenen Konzentrationen getestet, sondern zwei verschiedene Glukosekonzentrationen zu den Zeitpunkten 0,5 min, 2,5 min und 5 min, um den Moment, ab dem der Unterschied zwischen Basalinflux und durch Glukosestimulation erhöhtem Influx maximal ist, zu bestimmen. Dazu werden eine 3,0 mM und eine 8,3 mM Glukoselösung eingesetzt.

4 Ergebnisse

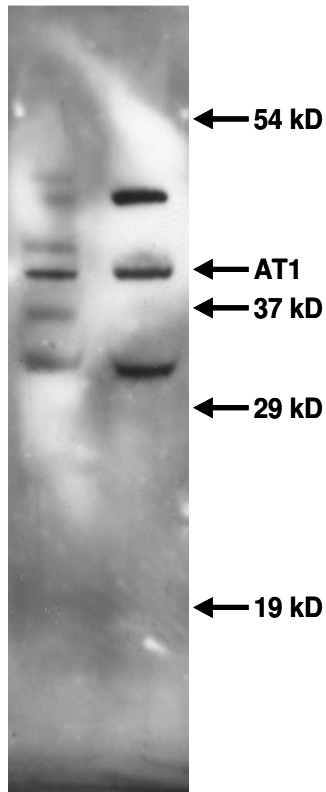
4.1 1D-SDS-PAGE/Western Blot

Bisher wurden Angiotensinrezeptoren an INS-1 Zellen nicht nachgewiesen oder untersucht. Angiotensinrezeptoren kommen aber im gesamten Pankreas vor. Im exokrinen Teil des Pankreas wird durch ANG II und seine Rezeptoren die Sekretion von Verdauungsenzymen und pH-Wert bestimmender Anionen beeinflusst. Außerdem kommen sie an Zellen der Blutgefäße und im endokrinen Pankreas vor. Um zu zeigen, dass der AT₁-Rezeptor auch in INS-1 Zellen zu finden ist, wurden INS-1 Zellen aus 75 cm² großen Zellkulturflaschen geerntet und mit Hilfe eines Ultraschallzelldesintegrators homogenisiert. Das so entstandene Zellhomogenat wurde durch Zentrifugation von großen Membranteilen und Zellorganellen befreit. Die übriggebliebene Membranfraktion wurde dann in der Ultrazentrifuge weiter aufkonzentriert und die Proteine durch 1D-SDS-PAGE aufgetrennt.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung konnte im Western Blot eine Hauptbande bei 43 kDa identifiziert werden (Abbildung 4-1). Diese Bande wird in Abbildung 4-1 durch den Pfeil, mit der Beschriftung AT₁, gekennzeichnet. Die übrigen Pfeile geben die Lage und das Molekulargewicht der benutzten Standard-Protein-Marker an. Dabei sind die Größenverhältnisse bzgl. des Abstands der Pfeile untereinander und der Lage auf dem gesamten Blot beibehalten worden.

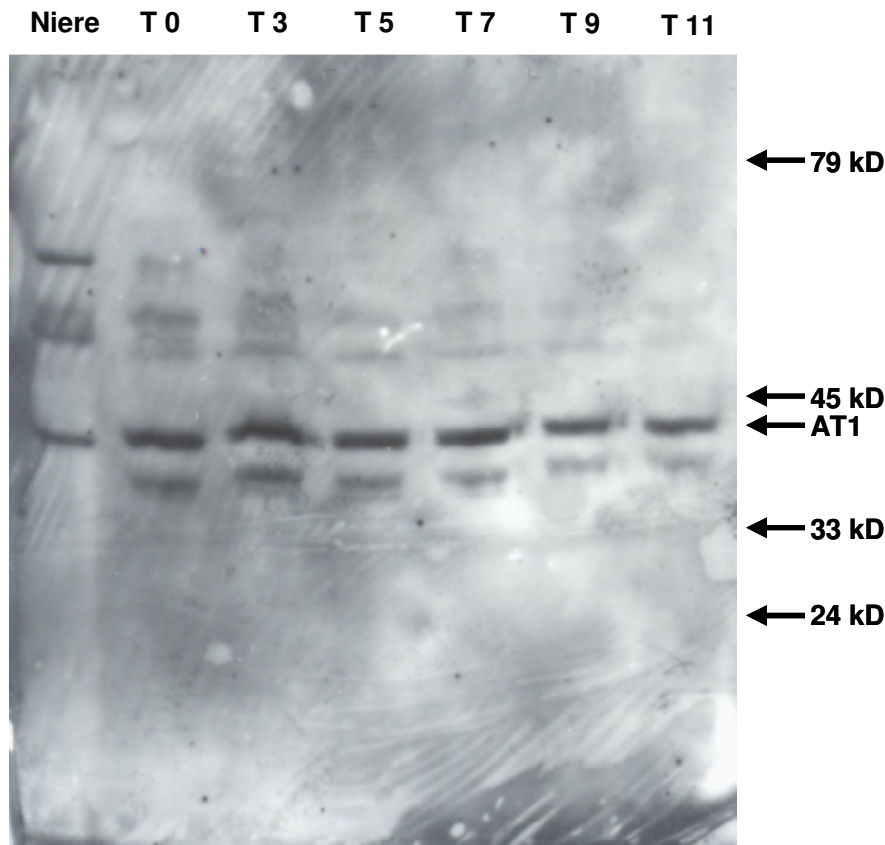
Wie zu erwarten zeigen auch die zur Kontrolle herangezogenen Zellen aus der Niere auf gleicher Höhe eine Bande. Weitere im Blot sichtbare Banden stellen unspezifische Kreuzreaktionen des sekundären Antikörpers dar, der keine exakte Spezifität für den ersten Antikörper besitzt. Er ist nur allgemein gegen Antikörper, die aus Kaninchen gewonnen werden, gerichtet und könnte deshalb auch mit Proteinen aus anderen Nagern reagiert haben. Dies könnte hier der Fall sein, da sowohl INS-1 als auch die Nierenzellen aus Ratten stammen.

INS-1 Niere



**Abbildung 4-1: Western Blot Analyse von INS-1 Zellen
Als Vergleich Niere von weibl. Wistar Ratten. Detektiert mit Hilfe eines polyklonalen
Antikörpers gegen den AT₁-Rezeptor und eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers**

Als weiteren Vergleich für die Plausibilität der bei den INS-1 Zellen gefundenen Bande wurden noch 3T3-L1 Zellen herangezogen. Diese aus Mäusen stammende präadipozytäre Zelllinie wurde nicht nur zu Vergleichszwecken, sondern auch noch auf die Fragestellung nach der Expression des AT₁-Rezeptors während der Konversion der 3T3-L1 Zellen von Fibroblasten zu Adipozyten hin untersucht. Auch diese Zellen zeigen wieder, verglichen mit einer Membranfraktion aus Niere von Wistar Ratten, eine Hauptbande bei 43 kDa. In Abbildung 4-2 kennzeichnet diese Bande der Pfeil mit der Angabe AT₁. Die Bedeutung der übrigen Pfeile ist wie oben beschrieben.



**Abbildung 4-2: Western Blot von 3T3-L1 Zellen
Als Vergleich Niere aus weibl. Wistar Ratten. Differenzierung von Fibroblasten (T0) zu
Adipozyten (T11)**

Des Weiteren bleibt festzuhalten, dass der AT_1 -Rezeptor während der gesamten Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten von 3T3-L1 Zellen exprimiert wird und dies mit annähernd gleicher Intensität, wobei diese bei ausdifferenzierten Adipozyten etwas schwächer zu werden scheint. Andere neben der Hauptbande aufgetretene Banden stellen wiederum Kreuzreaktionen mit dem Sekundärantikörper dar.

4.2 Bindungsstudien

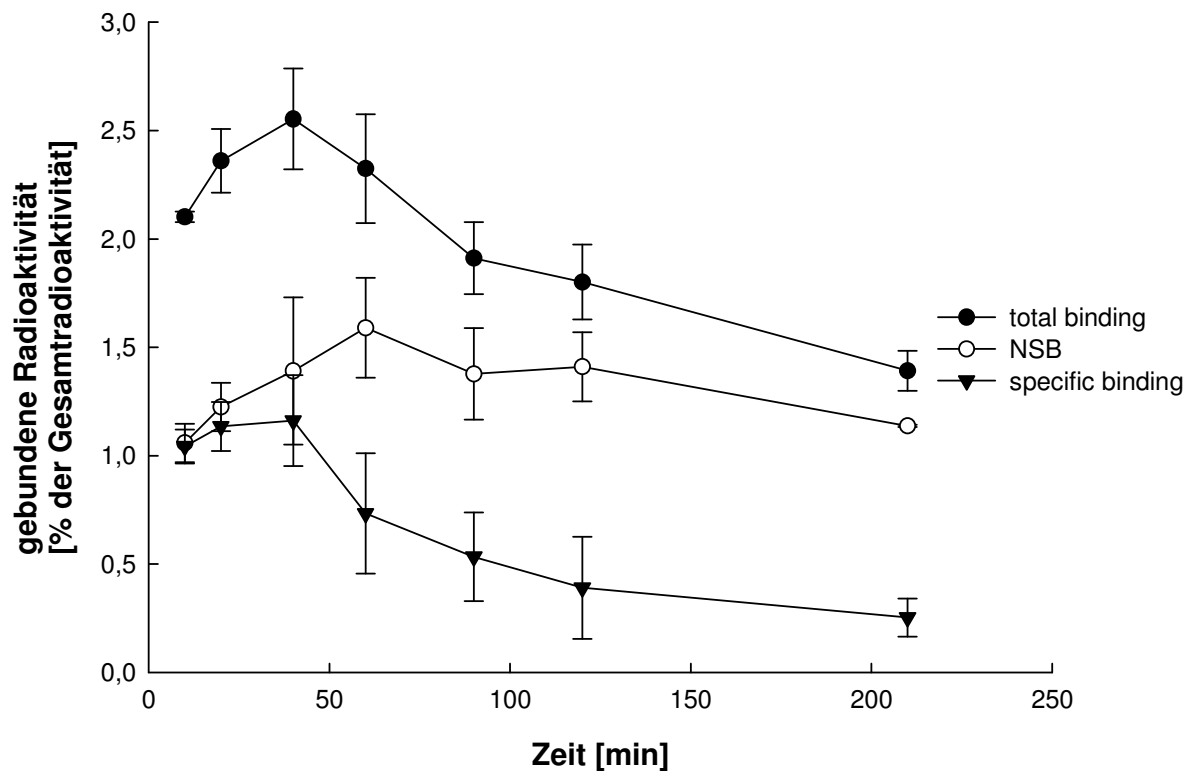
Zur weiteren Charakterisierung der ANG II-Bindungsstellen wurden Bindungsstudien mit [¹²⁵I]-ANG II durchgeführt.

4.2.1 Kinetik

Für die Verdrängungsversuche mit [¹²⁵I]-ANG II an INS-1 Zellen wurden erst Kinetikversuche (Assoziationsgeschwindigkeit) durchgeführt, um den Zeitpunkt zu bestimmen, zu dem die Bindung von [¹²⁵I]-ANG II an die INS-1 Zellen maximal ist. Dafür wurden die Zellen, die in einer 75 cm² Zellkulturflaschen gezüchtet wurden, geerntet und in 1 ml Inkubationspuffer suspendiert. 100 µl dieser Suspension werden dann mit 50 µl [¹²⁵I]-ANG II-Lösung (313 nM) und 50 µl Inkubationspuffer für das „total binding“ oder 50 µl Inkubationspuffer mit einem 1000-fachen Überschuss an unmarkiertem Liganden für das NSB inkubiert.

4.2.1.1 INS-1

Abbildung 4-3 zeigt eine maximale spezifische Bindung nach 40 min, die dann im weiteren zeitlichen Verlauf bis auf beinahe null absinkt. Die maximale, spezifische Bindung nach 40 min liegt nur bei ca. 1,2 % der eingesetzten Gesamtradioaktivität, aber auch das total binding erreicht bei seinem Maximum nur 2,5 %. Dies spricht zum einen dafür, dass es an der β-Zelle nur eine sehr geringe Anzahl von ANG II-Bindungsstellen gibt und zum anderen, dass ANG II durch membranständige Enzyme der β-Zelle schnell abgebaut wird, da auch das NSB zum Ende des Versuchs wieder sinkt.



**Abbildung 4-3: Zeitlicher Verlauf der Bindung von [125 I]-ANG II an INS-1 Zellen über 210 min
n = 3, $\bar{x} \pm \text{SEM}$**

Die Schwankungen des NSB liegen innerhalb eines Prozentpunktes und fallen hier deshalb so stark ins Gewicht, weil sie ca. 50 % des total bindings ausmachen und das total binding selbst so niedrig ist. Eine Erhöhung der Konzentration des dem Inkubationspuffer zugesetzten BSA, um unspezifische Bindungsstellen weiter abzusättigen, brachte keinen Vorteil (Werte wurden in die Abbildung integriert). Aufgrund dieser Ergebnisse und der starken Zeitabhängigkeit der Versuche wurden die ersten 60 min des Kinetikversuchs noch einmal genauer untersucht.

In Abbildung 4-4 wird deutlich, dass das Maximum der spezifischen Bindung schon nach 15 min erreicht ist, aber auch dann nur 1,7 % beträgt. Für den übrigen Graphen zeigt sich ein vergleichbarer Verlauf wie bei dem Versuch über 210 min. Nach einem anfänglich steilen Anstieg wird ein schnelles Maximum erreicht und danach fallen die Graphen für totale und spezifische Bindung wieder ab. Auch hier liegt die Zunahme der nichtspezifischen Bindung mit knapp unter einem Prozentpunkt in derselben Größenordnung wie in dem Versuch über 210 min.

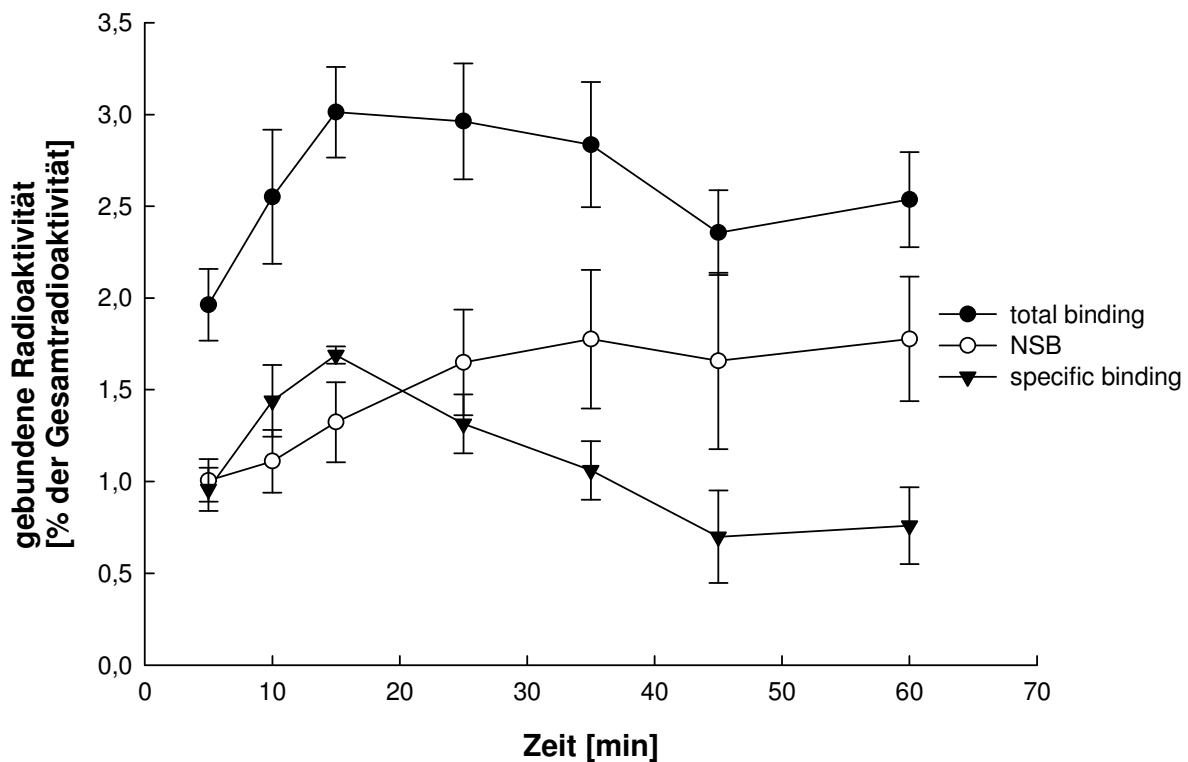


Abbildung 4-4: Zeitlicher Verlauf der Bindung von [125 I]-ANG II an INS-1 Zellen über 60 min
n = 3, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

Somit bestätigt der Versuch zum einen die Ergebnisse aus dem Versuch über 210 min, was die geringe Rezeptorzahl und den Abbau von ANG II betrifft, aber zum anderen wird aufgrund des Ergebnisses die Inkubationszeit für die weiteren Versuche von zunächst angenommenen 40 min auf 15 min verkürzt.

4.2.1.2

3T3-L1

Als Vergleich zu den Ergebnissen, die mit [125 I]-ANG II an INS-1 Zellen erzielt wurden, wurden auch noch Bindungsstudien an 3T3-L1 Zellen durchgeführt, da zu dieser Zelllinie schon Erfahrungen und Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe vorlagen [169]. Zur Bestätigung der alten Ergebnisse und Einordnung der neuen Ergebnisse wurden, wie für die INS-1 Zellen, erst Kinetikversuche mit [125 I]-ANG II an den 3T3-L1 Zellen durchgeführt. Dafür wurden auch Zellen geerntet und in Inkubationspuffer suspendiert, mit [125 I]-ANG II versetzt und entweder mit Inkubationspuffer oder einem Überschuss an kaltem Liganden auf ein Inkubationsvolumen von 200 μl aufgefüllt. Durch Abbildung 4-5 werden die Ergebnisse von Weiland et al. [169] bzgl. der Bindungskinetik von [125 I]-ANG II an 3T3-L1 Fibroblasten bestätigt.

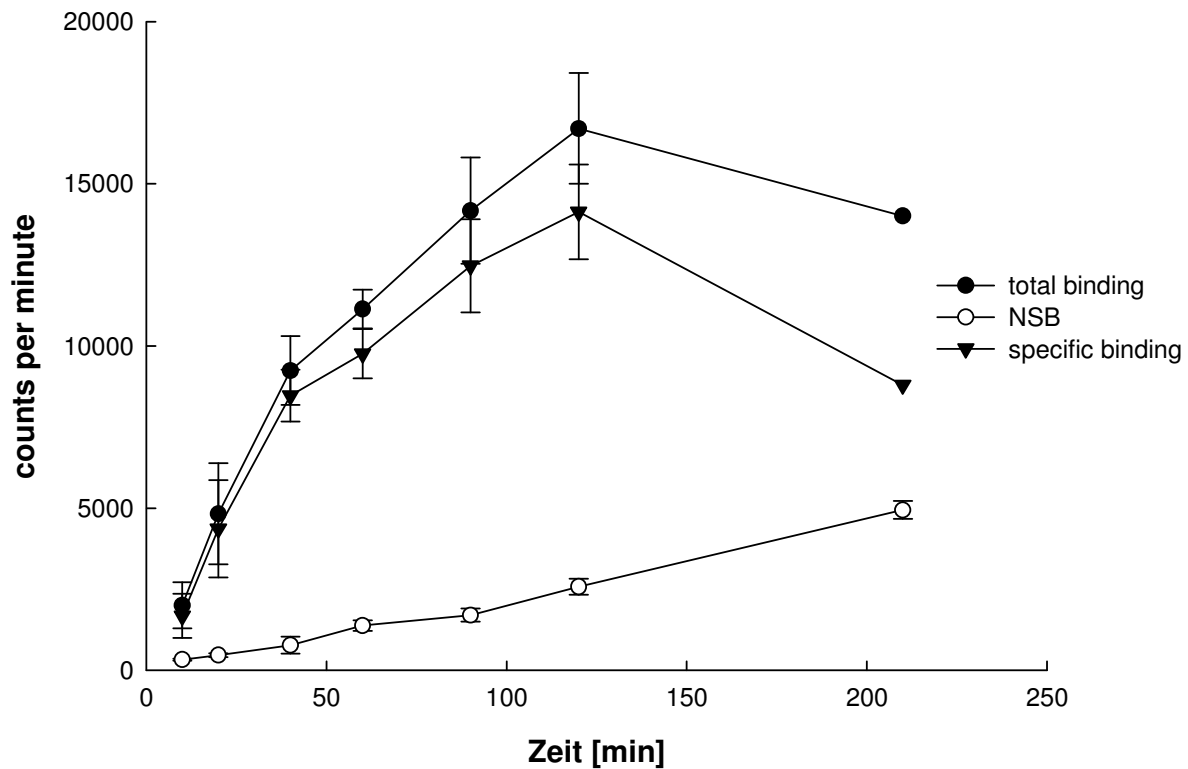


Abbildung 4-5: Zeitlicher Verlauf der Bindung von [125 I]-ANG II an 3T3-L1 Zellen über 210 min
n = 1-2, $\bar{x} \pm \text{SEM}$

Es zeigt sich eine maximale spezifische Bindung nach 2 h. Zwar scheint es nach 210 min zu einem Abbau des [125 I]-ANG II zu kommen, aber da für diesen Wert bei der totalen Bindung nur n = 1 Versuche gemacht worden sind, sollte dies nicht als gesichert angesehen werden.

Dies ist aber auch unerheblich, da bereits nach 120 min ein genügend großer Abstand, was die CPM^{LIX}-Werte betrifft, zwischen spezifischer und nicht spezifischer Bindung (NSB) besteht. Deshalb wurde für weitere Versuche mit 3T3-L1 Fibroblasten 120 min als Inkubationszeit gewählt. Ferner bleibt festzuhalten, dass selbst ein Anstieg des NSB auf ca. 20 %, wie bei den Fibroblasten, nicht ins Gewicht fällt, wenn genügend spezifische Bindungsstellen vorhanden sind.

^{LIX} CPM: counts per minute

4.2.2 Verdrängungsversuche

4.2.2.1 INS-1

Aufgrund der Kinetikversuche wurden die INS-1 Zellen bei den Verdrängungsversuchen 15 min lang mit einer steigenden Konzentration mit nicht radioaktiv markiertem Liganden inkubiert. Hierfür wurden die INS-1 Zellen wie bei den Kinetikversuchen vom Boden der Zellkulturflaschen abgeschabt und nach einigen Waschsritten in Inkubationspuffer suspendiert. Die nichtspezifische Bindung wurde wieder durch die Zugabe eines Überschusses von kaltem ANG II ermittelt. NSB wird von der Gesamtbindung abgezogen und nur die spezifische Bindung wird dargestellt.

Abbildung 4-6 zeigt die Verdrängung von [¹²⁵I]-ANG II durch ANG II an INS-1 Zellen. Durch den gefitteten Kurvenverlauf mit einem Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,99$ lässt sich nur eine sehr niederaffine Bindungsstelle mit einem K_D von $1,1 \mu\text{M}$ identifizieren. Eine hochaffine Bindungsstelle im nanomolaren Bereich, wie sie zu erwarten gewesen wäre, konnte nicht nachgewiesen werden. Ein Grund für das Fehlen dieser nanomolaren Bindungsstelle könnte eine sehr geringe Anzahl an Bindungsstellen für ANG II sein, da sich selbst bei gesicherter Anwesenheit von ANG II-Bindungsstellen nur kleine Verdrängungssprünge im nanomolaren Bereich nachweisen lassen (vgl. 4.2.1 und 4.2.2.2).

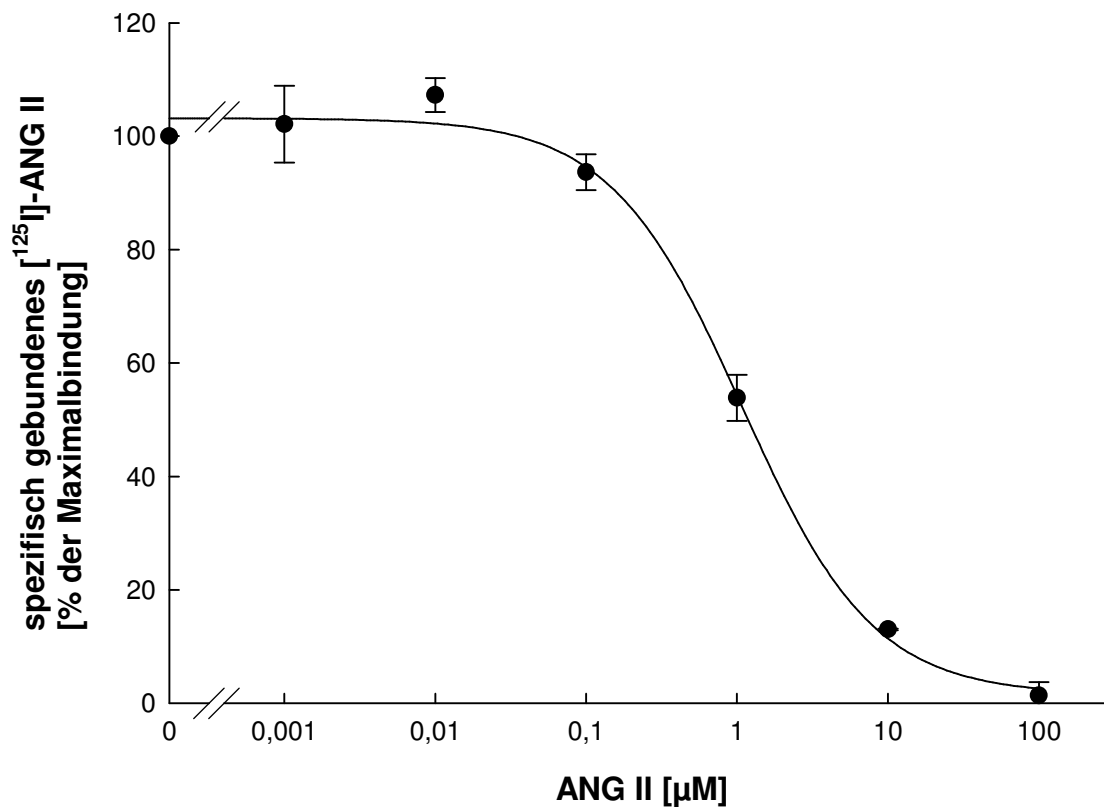


Abbildung 4-6: Verdrängung von $[^{125}\text{I}]\text{-ANG II}$ durch ANG II an INS-1 Zellen
 $n = 2-5$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $K_D: 1,1 \mu\text{M}$ $R^2: 0,99$

Aufgrund der Erkenntnisse aus Kinetikversuchen bzgl. des Abbaus von ANG II wurde auch eine Verdrängungsstudie mit dem nicht so proteaselabilen ANG II -Analogon Sarile durchgeführt. Durch den Austausch von Asp durch Sarcosin (N-Methylglycin) an Position 1 und von Phe durch Ile an Position 8 kann Sarile nicht mehr so leicht durch Proteasen abgebaut werden.

Doch auch Sarile konnte, wie in Abbildung 4-7 zu sehen ist, ANG II nicht im nanomolaren Bereich aus seiner Bindung verdrängen. Durch den berechneten Kurvenverlauf mit $R^2 = 0,99$ ergibt sich ein K_D -Wert von $64 \mu\text{M}$, der aufgrund der veränderten Struktur von Sarile um etwa den Faktor 5 größer ist als bei ANG II .

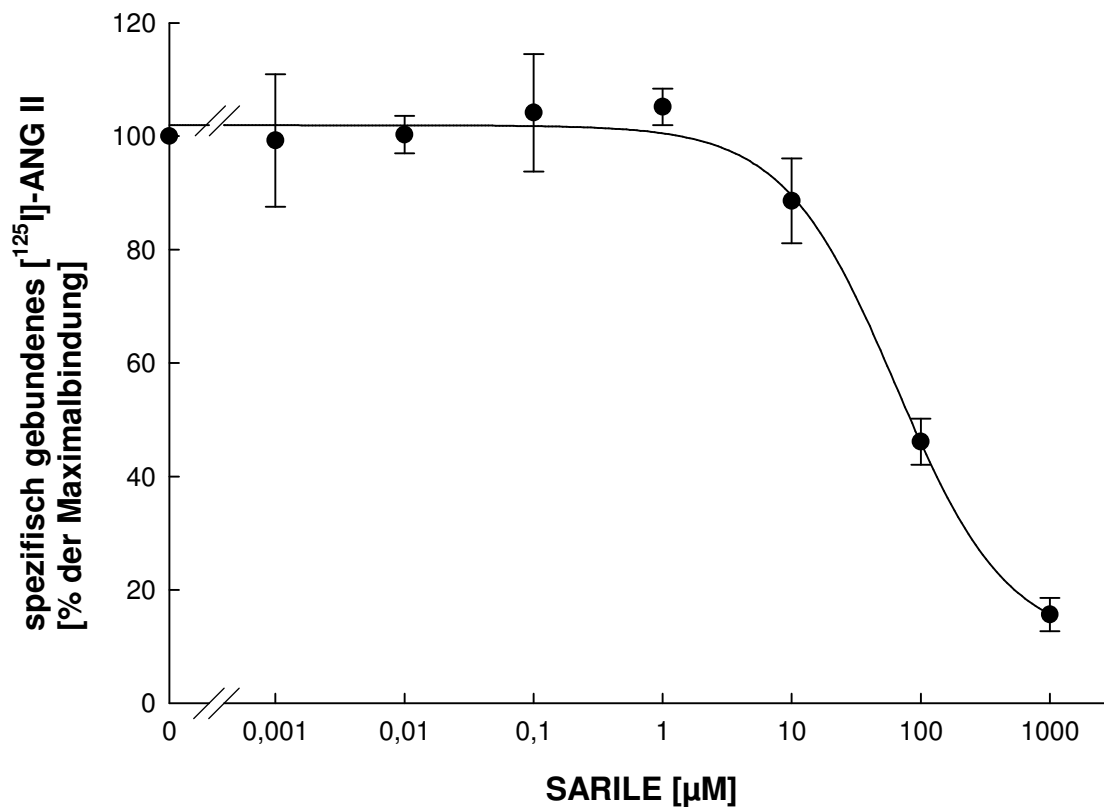


Abbildung 4-7: Verdrängung von [^{125}I]-ANG II durch Sarile an INS-1 Zellen
 $n = 2-4$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $K_D: 64 \mu\text{M}$, $R^2: 0,99$

Um den in der SDS-PAGE/Western Blot Untersuchung nachgewiesenen AT_1 -Rezeptor noch weiter zu charakterisieren, wurde eine Verdrängungsstudie mit Losartan durchgeführt.

Da eine alleinige Verdrängung von [^{125}I]-ANG-II durch Losartan keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte (Daten nicht gezeigt), wurde versucht, durch Zugabe von Losartan ($1 \mu\text{M}$) zu dem Verdrängungsversuch durch ANG II entweder eine Absenkung oder Linksverschiebung der Verdrängungskurve zu erreichen. Hierfür wurde in einem Versuch mit Losartan 30 min vorinkubiert und zwei weitere ohne Vorinkubation durchgeführt. Da sich aber kein Unterschied bei den beiden Versuchsanordnungen ergab, wurden die Ergebnisse in Abbildung 4-8 zusammengefasst. Hier sieht man, dass die Verdrängungskurve, obwohl die Werte im nanomolaren Bereich über 100 % liegen, einen ähnlichen Verlauf nimmt wie bei ANG II alleine. Die höheren Bindungswerte im nanomolaren Bereich sind so nicht zu erklären, da eine positive Kooperation von Losartan mit [^{125}I]-ANG II, aber nicht mit ANG II, äußerst unwahrscheinlich ist. Der veränderte K_D -Wert von jetzt $0,5 \mu\text{M}$ liegt eine halbe Zehnerpotenz unter dem von ANG II alleine. Dies ist nur eine geringe

Verschiebung und der K_D -Wert liegt immer noch im sehr hohen nanomolaren Bereich, gibt aber trotzdem einen Hinweis auf den AT_1 -Rezeptor.

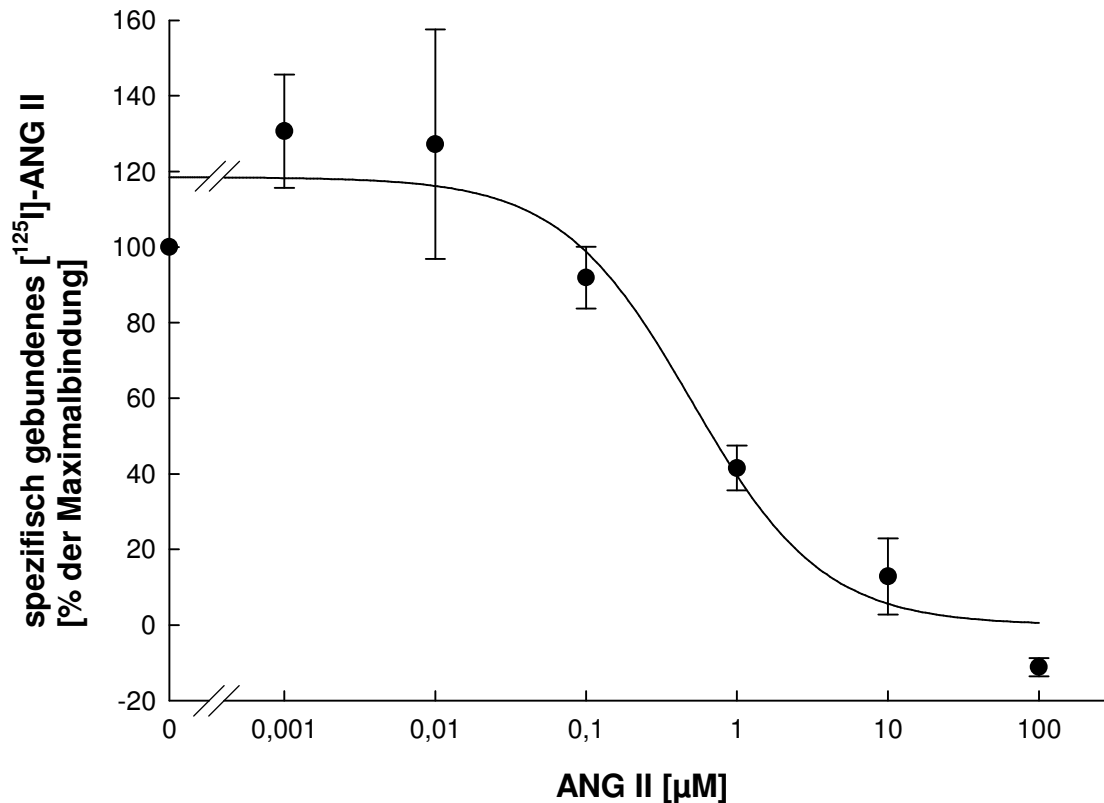


Abbildung 4-8 Verdrängung von [125 I]-ANG II durch ANG II + 1 μ M Losartan an INS-1 Zellen
 $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $K_D: 0,5 \mu\text{M}$, $R^2: 0,95$

4.2.2.2

3T3-L1

Wie schon bei den Kinetikversuchen erwähnt, wurde zum Vergleich zu den Ergebnissen, die mit den INS-1 Zellen erzielt wurden, die 3T3-L1 Zelllinie herangezogen. Aufgrund der bisherigen Erfahrungen und den Ergebnissen aus den Kinetikversuchen, wurden 120 min als Inkubationszeit für die Verdrängungsversuche festgelegt. Der Versuch selbst wurde abgesehen von der Inkubationszeit genau wie für die INS-1 Zellen durchgeführt.

In Abbildung 4-9 sieht man, dass schon im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich die Werte für die Bindung unter 100 % liegen. Dadurch ergibt sich im gemodelten Graphen ein biphasischer Kurvenverlauf mit $R^2 = 0,99$, einer hochaffinen Bindungsstelle mit einem K_D -Wert von $K_{D1}: 0,3 \text{ nM}$ und einer niederaffinen Bindungsstelle mit einem K_D -Wert von $K_{D2}: 5,6 \mu\text{M}$. Fittet man die Kurve nur für die niederaffine Bindungsstelle, ergibt sich ein Korrelationskoeffizient

von nur $R^2 = 0,98$, sodass der biphasische Verlauf als richtig angenommen werden kann. Würde andersherum nur die nanomolare Bindungsstelle als richtig angesehen, läge das NSB bei ca. 85 %. Dies führt zu dem Schluss, dass im Ganzzellversuch nur wenige membranständige Rezeptoren zu finden sind.

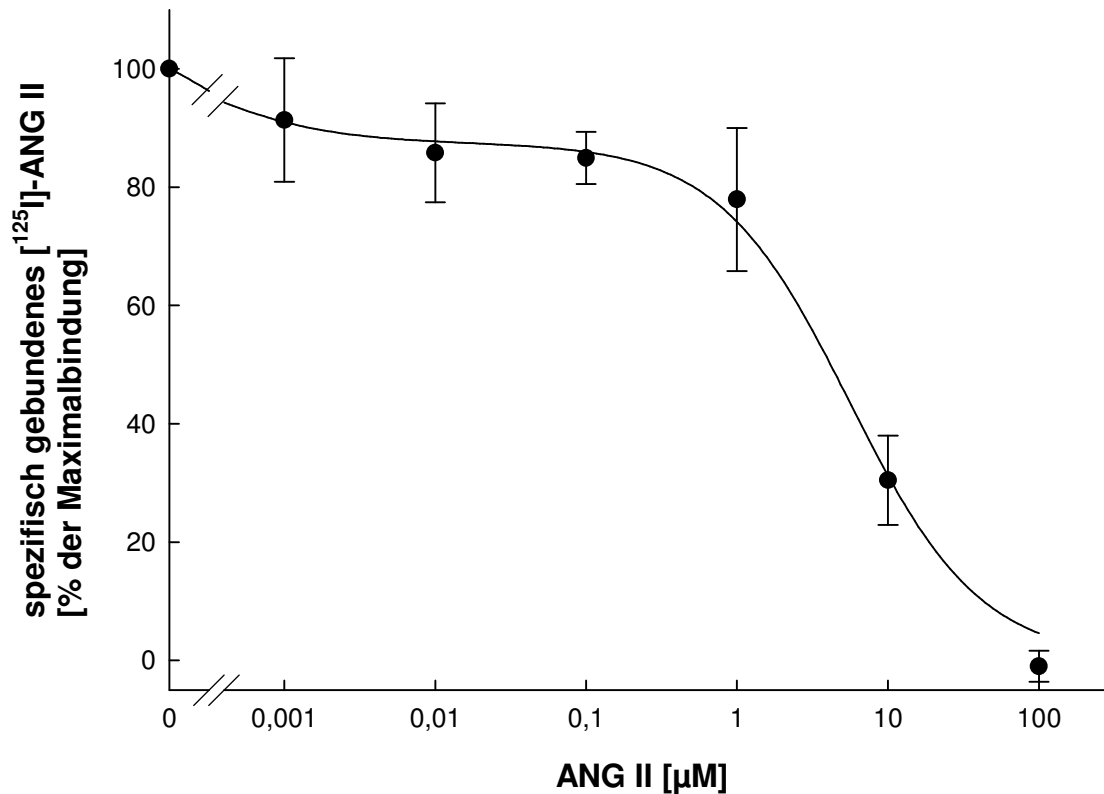


Abbildung 4-9: Verdrängung von $[^{125}\text{I}]$ -ANG II durch ANG II an 3T3-L1 Fibroblasten
 $n = 4$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$, K_{D1} : 0,3 nM, K_{D2} : 5,6 µM, R^2 : 0,99

Für die Versuche mit 3T3-L1 Adipozyten musste ein anderer Versuchsaufbau gewählt werden, da bei einem Versuchsaufbau, bei dem die Zellen suspendiert werden, sich die Adipozyten nicht durch Zentrifugation abtrennen lassen. Deswegen wurden 3T3-L1 Fibroblasten in 24er Multiwell Platten ausgesät und über elf Tage zu Adipozyten ausdifferenziert. Am Versuchstag (Tag 12 nach Beginn der Differenzierung) wurden die Zellen gewaschen und mit 100 µl Inkubationspuffer, 50 µl $[^{125}\text{I}]$ -ANG II-Lösung und 50 µl kaltem Liganden in aufsteigenden Konzentrationen über 120 min inkubiert, um ähnliche Versuchsbedingungen bzgl. Inkubationsvolumen und Konzentration der Radioaktivität, verglichen mit den Suspensionsversuchen, zu haben. Abbildung 4-10 zeigt die Verdrängung von $[^{125}\text{I}]$ -ANG II durch Losartan an 3T3-L1 Adipozyten. Auch bei dem selektiven, nicht peptidischen AT_1 -Rezeptorantagonisten sieht man einen biphasischen

Kurvenverlauf, wie er schon an den Fibroblasten bei der Verdrängung durch ANG II zu sehen war.

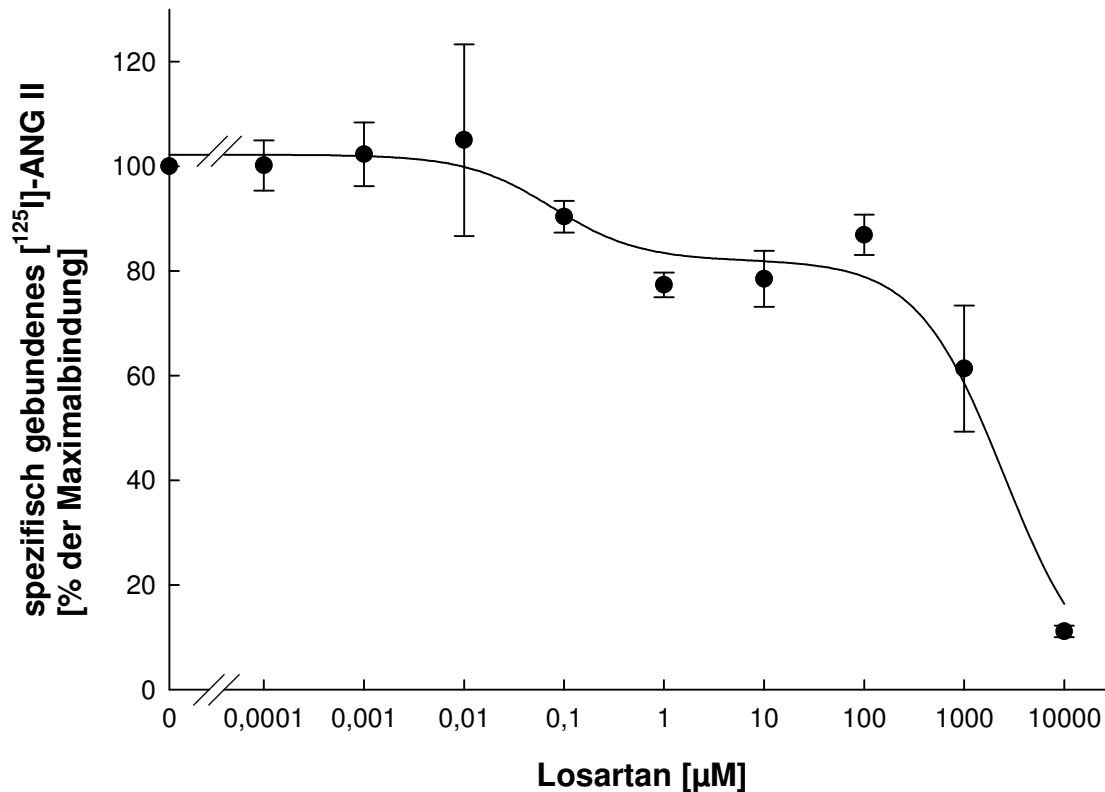


Abbildung 4-10: Verdrängung von [^{125}I]-ANG II durch Losartan an 3T3-L1 Adipozyten
 $n = 2$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$, K_{D1} : 76,7 nM, K_{D2} : 2,5 mM

Dies bestätigt zum einen die Vermutungen über die Rezeptorzahl und schließt zum anderen die Möglichkeit aus, dass die niederaffine Bindungsstelle durch proteolytische Abbauprodukte zustande kommt, also selektiv für ANG II und der hochaffinen Bindungsstelle sehr ähnlich sein muss. Die zwei Bindungsstellen für Losartan haben die K_D -Werte von 76,7 nM für die hochaffine und 2,5 mM für die niederaffine Bindungsstelle.

4.3 Insulinsekretion/Radioimmunoassay

Um zu testen, ob ANG II über den nachgewiesenen AT₁-Rezeptor Einfluss auf die Insulinsekretion nehmen kann, wurden *in vitro* Sekretionsversuche an INS-1 Zellen durchgeführt. Dafür wurden INS-1 Zellen in 24er Multiwell Platten ausgesät und fünf bis sechs Tage bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Nach zweimaligem Waschen unter Eiskühlung wurden die Zellen mit KRH-Puffer, der 5,6 mM Glukose und ANG II in verschiedenen Konzentrationen enthielt, für 90 min im Brutschrank inkubiert. Zur Kontrolle der Sekretionsfähigkeit der Zellen wurden bei jedem Versuch auch zwei Wells mit einer niedrigen Glukosekonzentration (3,0 mM, Negativkontrolle) und dem Sulfonylharnstoffderivat Glibenclamid (1 µg/ml, Positivkontrolle) mit inkubiert. Die Inkubation wurde durch Kühlung der Multiwellplatten in einem Eiswasserbad gestoppt. Das während der Inkubationszeit in das überstehende Medium kumulativ abgegebene Insulin wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassays bestimmt. Dazu wurden die aus dem Sekretionsversuch erhaltenen Proben zuerst verdünnt und dann mit ¹²⁵I markiertem Insulin und einem primären Antikörper gegen Insulin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde mit einem zweiten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, für zwei Stunden inkubiert und das entstandene Insulin-Antikörperkonglomerat unter Zuhilfenahme eines Carriers, der die Löslichkeit der Antikörper herabsetzt, ausgefällt und abzentrifugiert. Aus der nun im Pellet gebundenen Radioaktivität, die in einem antiproportionalen Verhältnis zur eingesetzten Insulinmenge aus den Sekretionsversuchen steht, konnte dann eben diese Insulinmenge berechnet werden. Bei der Auswertung wurden Versuche, bei denen es keinen Unterschied zwischen der Stimulation durch 5,6 mM Glukose alleine und Glibenclamid (=Positivkontrolle) gab, nicht berücksichtigt. Außerdem wurden Werte, die, bezogen auf eine ANG II-Konzentration, außerhalb eines 95 % Konfidenzintervalls lagen, nicht in die Auswertung mit aufgenommen (=Ausreißer). Dabei ergab sich für ANG II, wie in Abbildung 4-11 zu sehen ist, zwischen 0,01 nM und 1 nM eine dosisabhängige Insulinsekretionssteigerung. Bei 10 nM ist die Sekretionssteigerung zwar etwas geringer als bei 1 nM, aber immer noch statistisch hoch signifikant größer als durch 5,6 mM Glukose alleine. Warum bei höheren Konzentrationen die Sekretion wieder abnimmt ist zunächst nicht zu erklären, wurde aber auch schon für andere Peptide in anderen Zusammenhängen beschrieben.

Diese Ergebnisse bestätigen zwar nicht die Ergebnisse aus den Bindungsstudien, sind aber im Gegensatz zu ihnen eher erwartungsgemäß.

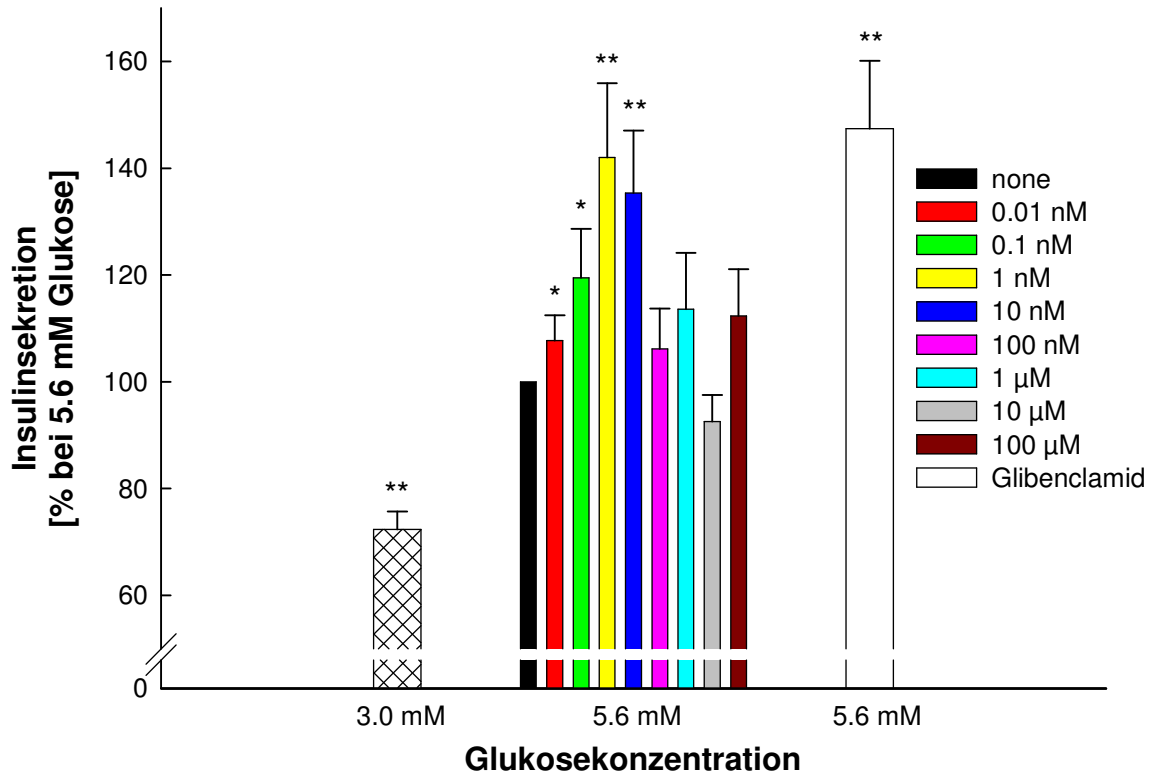


Abbildung 4-11: Effekt von ANG II auf die glukosestimulierte Insulinsekretion bei INS-1 Zellen
 $n = 17$, $\bar{x} + \text{SEM}$, * : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$ (verglichen mit 5,6 mM Glukose)

Um auszuschließen, dass es sich bei der gefundenen Steigerung der Insulinsekretion um einen Effekt anderer Angiotensinpeptide handelt, wurden Versuche mit dem proteasestabileren Angiotensinanalogen Sarile durchgeführt, das als partieller AT_1/AT_2 -Rezeptorantagonist ohne Anwesenheit eines Vollagonisten selbst agonistisch wirkt. Auch bei diesen Versuchen wurden sekretionsstimulatorisch indifferente Versuche (Glibenclamid-negative) nicht in die Auswertung mit einbezogen und Ausreißer die außerhalb eines 95 % Konfidenzintervalls lagen nicht berücksichtigt.

In Abbildung 4-12 sieht man, dass durch Sarile die Insulinsekretion zwischen 0,01 nM und 100 nM dosisabhängig gesteigert werden kann. Eine Dosis-/Wirkungskurve bis zu diesem Punkt würde, verglichen mit ANG II und wie schon bei den Verdrängungsversuchen gezeigt, eine Rechtsverschiebung aufweisen, die vermutlich durch die veränderte Struktur zu begründen ist. Bei höheren Konzentrationen als 100 nM zeigt sich wie bei ANG II wieder eine nur geringfügig

gesteigerte Insulinsekretion. Aufgrund der Rechtsverschiebung des Wirkmaximums und weil durch Sarile die Insulinsekretion nicht so stark gesteigert wurde wie durch ANG II, wurde für die weiteren Versuch ANG II verwendet.

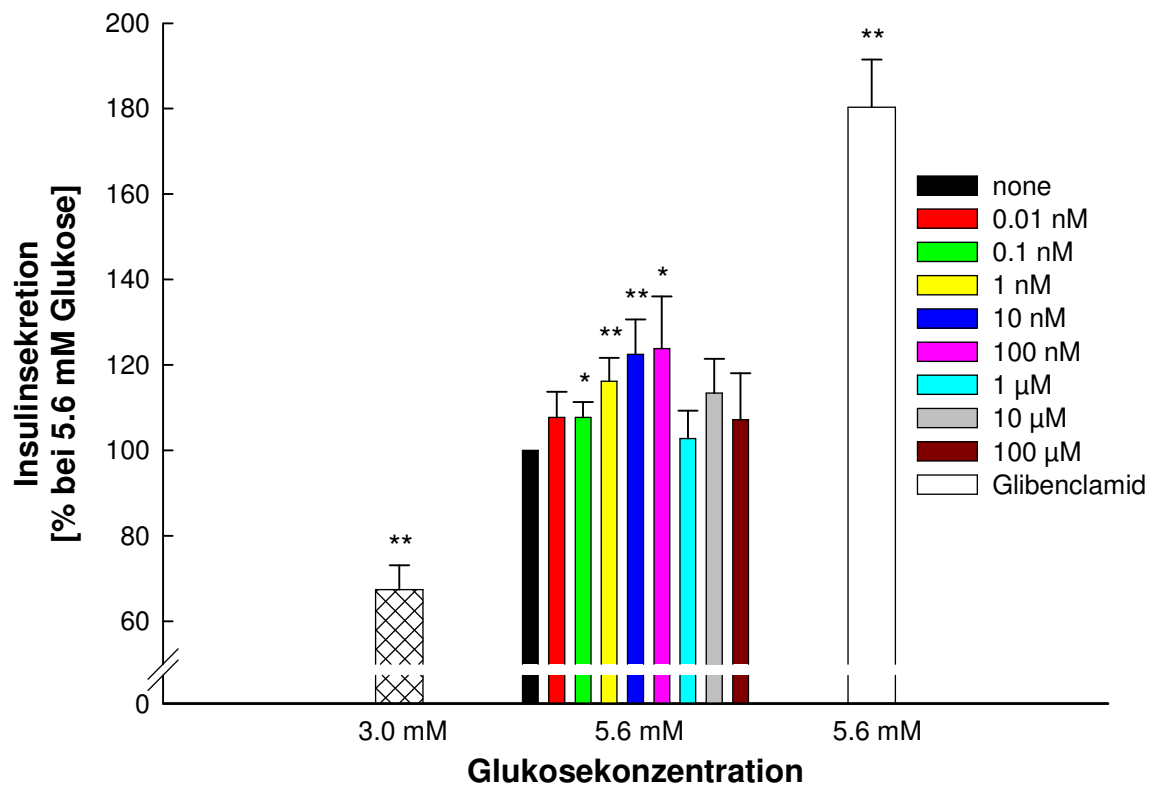


Abbildung 4-12 Effekt von SARILE auf die glukosestimulierte Insulinsekretion bei INS-1 Zellen
 $n = 10$, $\bar{x} + \text{SEM}$, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$ (verglichen mit 5,6 mM Glukose)

Da durch verschiedene Forschergruppen teils sehr unterschiedliche Ergebnisse bzgl. der Insulinsekretion unter Einfluss von ANG II gefunden wurden und dabei auch mit sehr unterschiedlichen Glukosekonzentrationen gearbeitet wurde, sollte dies weiter untersucht werden. Dafür wurden Versuche bei einer nicht stimulatorischen Glukosekonzentration von 3,0 mM (Negativkontrolle in den vorherigen Versuchen), einer physiologisch stimulierenden Glukosekonzentration von 5,6 mM und einer überstimulatorischen Glukosekonzentration von 16,7 mM gemacht. ANG II wurde in den Konzentrationen 0,1 und 1 nM zugesetzt. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden wiederum Ausreißer nach der zwei σ -Regel nicht mit einbezogen.

Abbildung 4-13 zeigt, dass bei allen drei Glukosekonzentrationen die Insulinsekretion gesteigert werden kann, aber nur bei der physiologischen Glukosekonzentration die Stimulation statistisch signifikant ist. Das es hier nicht zu einer Dosisabhängigkeit kommt, wie sie in den vorherigen Versuchen zu sehen war, ist nicht zu erklären.

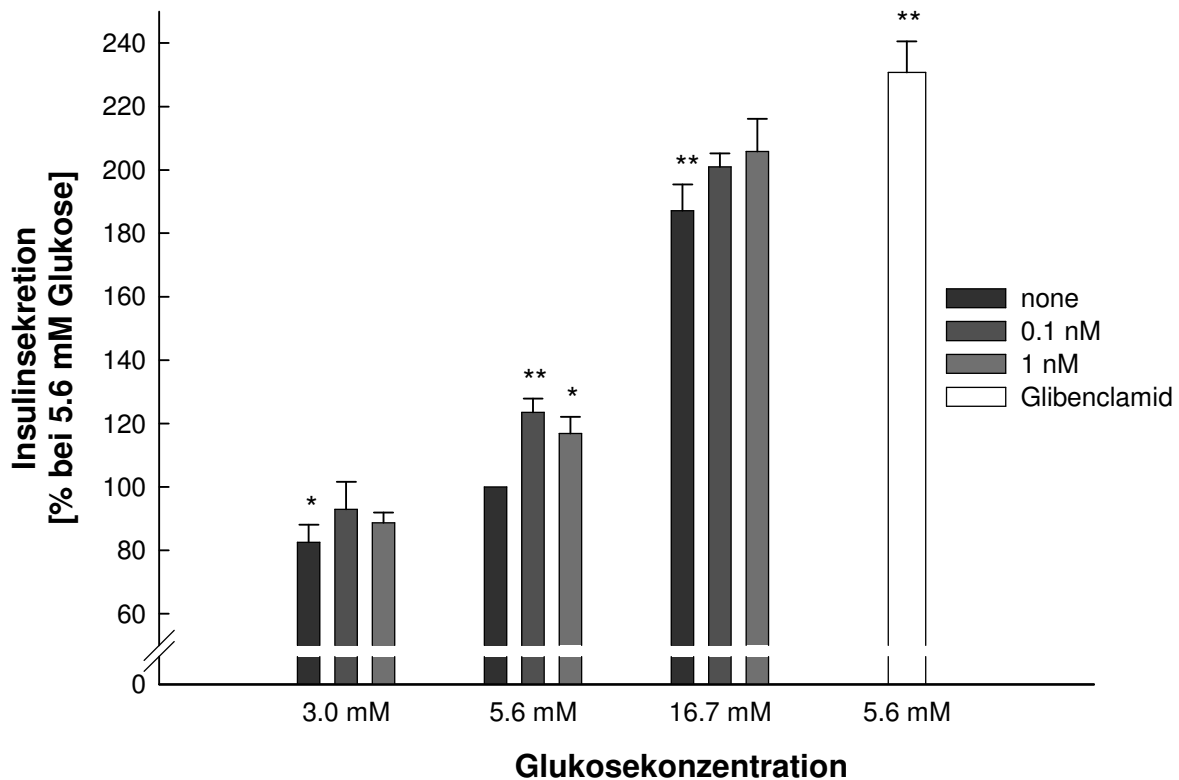


Abbildung 4-13: Effekt von ANG II auf die glukosestimulierte Insulinsekretion bei verschiedenen Glukosekonzentrationen
 n = 4, $\bar{x} + \text{SEM}$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$ (verglichen mit 5,6 mM Glukose)

Aufgrund der Ergebnisse aus der Western Blot Analyse, den Verdrängungsstudien und der Resultate anderer Forschergruppen, wurde auch untersucht, ob der Einfluss, den ANG II auf die Insulinsekretion ausübt, über den AT_1 -Rezeptor stattfindet. Dafür wurden INS-1 Zellen wieder mit drei verschiedenen Glukosekonzentrationen und ANG II in den Konzentrationen 0,1 und 1 nM inkubiert.

Um eindeutig nachzuweisen, dass der Einfluss von ANG II über den AT_1 -Rezeptor vermittelt wird, wurde der AT_1 -Rezeptor durch eine 20-minütige Vorinkubation mit Losartan blockiert. Für die Auswertung wurden wieder Ausreißer, die außerhalb eines 95 % Konfidenzintervalls lagen, eliminiert.

In Abbildung 4-14 ist wieder deutlich der Unterschied in der sekretorischen Stimulation durch die drei verschiedenen Glukosekonzentrationen zu sehen. Glibenclamid zeigt eine nicht so große Steigerung der Insulinsekretion wie in anderen Versuchen, aber immer noch deutlich mehr Insulinsekretion als 5,6 mM Glukose. In dieser Versuchsreihe konnte ANG II die Insulinsekretion nicht in der niedrigen Konzentration von 0,1 nM steigern. Eine statistisch signifikante Steigerung

gab es nur bei 5,6 mM Glukose und 1 nM ANG II, wobei bei 3,0 und 16,7 mM Glukose auch eine deutliche Tendenz zu erkennen ist. Der Effekt, den ANG II auf die Insulinsekretion ausübt, kann durch Losartan blockiert werden und ist für 3,0 und 5,6 mM auch statistisch signifikant. Warum Losartan bei 5,6 mM Glukose die Insulinsekretion steigert ist nicht zu erklären, aber zu diesem Wert liegen auch nur $n = 2$ Einzelversuche vor. Ansonsten hat Losartan keinen Eigeneffekt auf die Insulinsekretion.

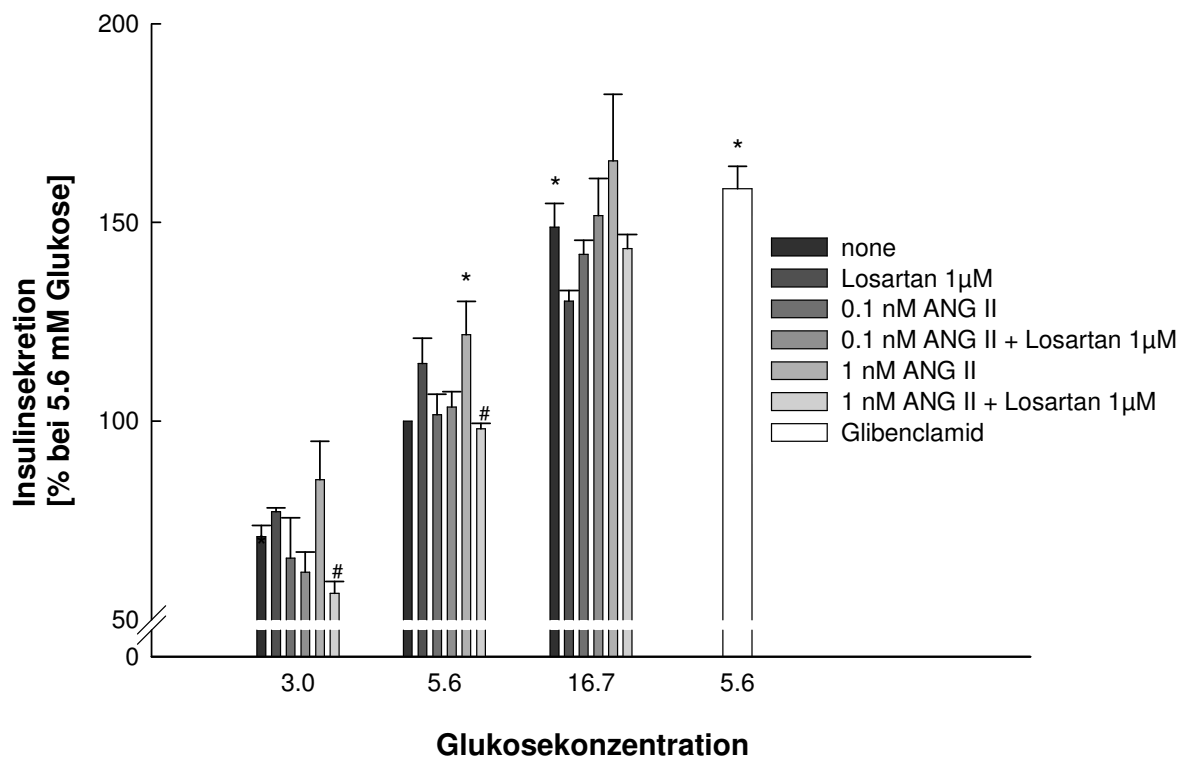


Abbildung 4-14: Effekt von ANG II und Losartan auf die glukosestimulierte Insulinsekretion
 $n = 2-12$, $\bar{x} + \text{SEM}$, *: $p \leq 0,05$ (verglichen mit 5,6 mM Glukose), #: $p \leq 0,05$ (verglichen mit der Stimulation durch ANG II)

4.4 ⁴⁵Calciumaufnahme

Da wie gezeigt ANG II die Insulinsekretion steigert, sollte mit Hilfe von Versuchen, welche die Aufnahme von Ca^{2+} aus dem umgebenden Medium dokumentieren, gezeigt werden, ob dies bei der Sekretionssteigerung von Bedeutung ist.

4.4.1 Kinetik

Wie schon für die Rezeptorbindungsstudien beschrieben, ist es sinnvoll bei rezeptorbedingten Effekten an Zellen zunächst einen Versuch zur Kinetik durchzuführen. Deshalb wurde für die Aufnahme von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ein zeitabhängiger Versuch durchgeführt, um zu sehen, wann ein maximaler Effekt bei der Aufnahme von Ca^{2+} bei einer nicht stimulatorischen und einer stimulatorischen Glukosekonzentration auftritt. Hierfür wurden INS-1 Zellen in 24er Multiwellplatten 5 bis 6 Tage bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Für den Versuch wurden die Zellen zweimal gewaschen und anschließend 20 min mit einer 3,0 mM Glukoselösung im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Glukoselösung abgesaugt, nochmals gespült und dann eine der Glukoselösungen, die pro Well 0,95 $\mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ enthielt, zugegeben. Um den Versuch bei verschiedenen Zeitpunkten zu stoppen wurde erst ein Aliquot aus dem Überstand entnommen, um ein Verhältnis aus der Radioaktivität im Überstand und der aufgenommenen Menge bilden zu können, dann der restliche Überstand abgesaugt und noch zweimal mit eiskaltem KRH-Puffer gespült. Als Glukosekonzentrationen wurden 3,0 mM als nicht stimulatorische und 8,3 mM als stimulatorische Konzentration gewählt, um einen sicheren Effekt zu erzielen (vgl. 4.4.2, 4.4.3). Für die Aufnahmeversuche mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ wurde jede Platte als Einzelversuch gewertet, auf der dann 4 abhängige Versuche zeilenweise pro Platte durchgeführt wurden. Ausreißer wurden wie schon in den anderen Versuchen durch die zwei σ -Regel entfernt.

Bei dem Kinetikversuch ergab sich wie in Abbildung 4-15 zu sehen ist, kein Unterschied in der Aufnahme von Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum nach 30 sec. Der Unterschied nach 2,5 bzw. 5 min ist deutlich zu erkennen und steigt nach 2,5 min nicht mehr. Es ist dann nur noch ein linearer Anstieg der aufgenommenen Radioaktivität bei beiden Konzentrationen zu erkennen, der auf eine unspezifische

Aufnahme zurückzuführen ist. Für die weiteren Aufnahmeversuche wurde aber trotzdem zunächst ein Zeitraum von 5 min als Inkubationszeit gewählt, um sicherzustellen dass durch eventuelle Schwankungen nach 2,5 min die Ergebnisse nicht verfälscht werden.

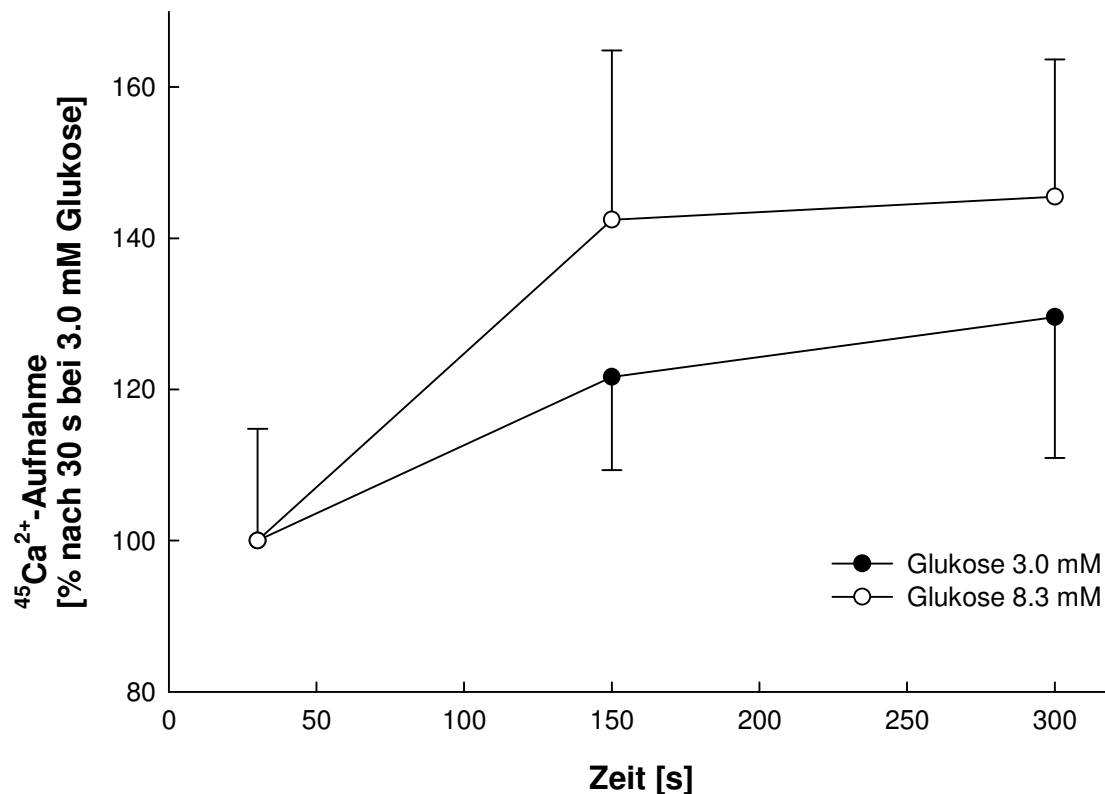


Abbildung 4-15: Effekt unterschiedlicher Glukosekonzentrationen auf die zeitabhängige Calciumaufnahme

n = 3 (unabhängige Versuche, durchgeführt als Vierfachbestimmung)

\bar{x} + SEM (8,3 mM Glukose), \bar{x} - SEM (3,0 mM Glukose)

4.4.2 5 min

Für die Aufnahmeversuche wurden die Zellen wie für die Kinetikversuche vorbehandelt und auch hier wurden pro Platte und damit Einzelversuch vier abhängige Teilversuche gemacht. Geändert wurde die stimulatorische Glukosekonzentration auf 5,6 mM, um einen direkten Bezug auf die Sekretionsversuche zu haben. Des Weiteren wurde 1 nM ANG II als zusätzlicher Stimulus zu den beiden Glukosekonzentrationen untersucht, da diese Konzentration in den Sekretionsversuchen deutliche Sekretionssteigerungen zeigte. Als Positivkontrolle wurde wie in den Sekretionsversuchen Glibenclamid benutzt.

Abbildung 4-16 zeigt, dass es durch ANG II zu keinem Unterschied in der Calciumaufnahme bei den beiden Glukosekonzentrationen kommt. Bei 5,6 mM Glukose ist zwar eine Tendenz zu erkennen, diese ist aber nicht statistisch signifikant. Überraschenderweise zeigt sich aber auch kein Unterschied zwischen den beiden Glukosekonzentrationen, wohingegen Glibenclamid zu einer deutlich Steigerung des Calciuminfluxes führt. Da diese Versuche mit einer relativ hohen Passage gemacht wurden, wurde derselbe Versuch nochmals mit neu aufgetauten Zellen durchgeführt.

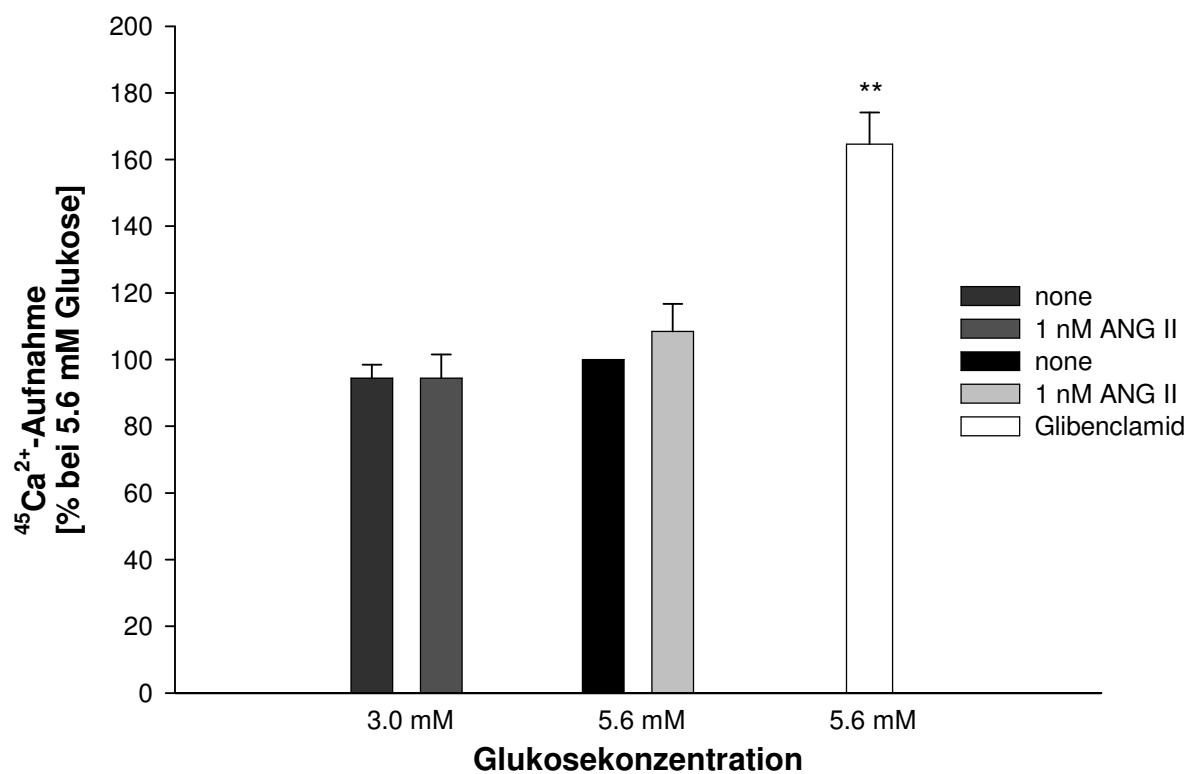


Abbildung 4-16: Effekt von ANG II bei verschiedenen Glukosekonzentrationen auf die Calciumaufnahme in die Zelle nach 5 min
 n = 3 (unabhängige Versuche durchgeführt als Vierfachbestimmung), $\bar{x} + \text{SEM}$, **: $p \leq 0,01$

4.4.3 2,5 min

Für die Versuche mit den frisch aufgetauten Zellen wurde zusätzlich noch die Inkubationszeit auf 2,5 min verkürzt, um zu gewährleisten, dass die nicht unterschiedlichen Werte nach 5 min nicht durch unspezifische Aufnahme von Radioaktivität bei 3,0 mM Glukose begründet sind. Außerdem wurden die Versuche mit und ohne Kühlung durchgeführt, um einen eventuellen Unterschied durch

proteolytischen Abbau zu erkennen. Hierbei ergab sich aber kein Unterschied, weshalb die Ergebnisse zusammengefasst wurden.

Wie in Abbildung 4-17 zu erkennen ist, wurden durch die neuen Zellen und die verkürzte Inkubationszeit die Ergebnisse der 5 min Untersuchung bestätigt.

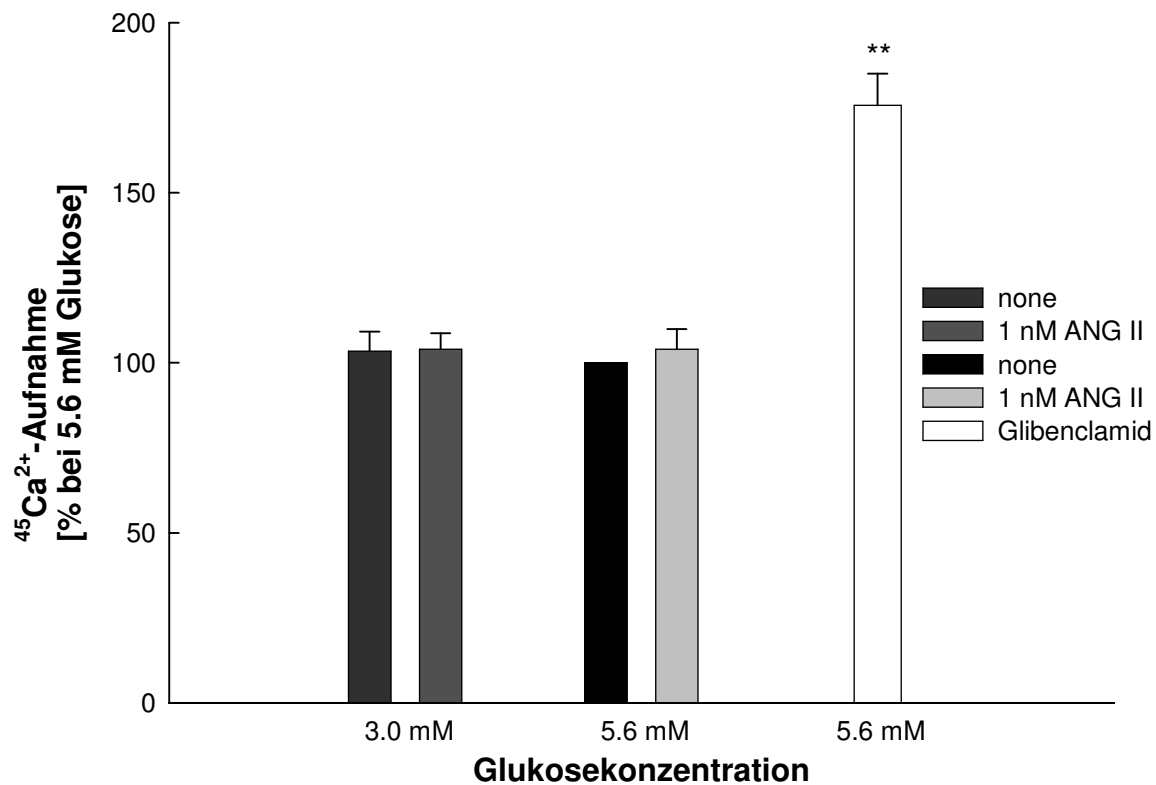


Abbildung 4-17: Effekt von ANG II bei verschiedenen Glukosekonzentrationen auf die Calciumaufnahme in die Zelle nach 2,5 min
 n = 5 (unabhängige Versuche durchgeführt als Vierfachbestimmung), $\bar{x} + \text{SEM}$, **: $p \leq 0.01$

Bezogen auf die Glukosestimulation könnte dies bedeuten, dass der Reiz durch 5,6 mM Glukose nicht für eine zusätzliche Calciumaufnahme aus dem Extrazelluarraum ausreicht oder dass die Calciumaufnahme schon bei 3,0 mM Glukose maximal ist. Beides scheint sehr unwahrscheinlich, da zum einen im Kinetikversuch die Aufnahme von Ca^{2+} durch 8,3 mM Glukose gesteigert werden konnte und zum anderen weil 5,6 mM Glukose ausreicht, um die Insulinsekretion zu steigern. Andererseits scheint gesichert, dass ANG II in der Konzentration von 1 nM die Calciumaufnahme nicht oder nur kaum beeinflusst. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass der AT_1 -Rezeptor an INS-1 Zellen die Insulinsekretion dadurch steigert, dass er klassisch G_q -gekoppelt ist und Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern

freisetzt. Der auch auftretende Nebenweg der G_s -Kopplung, der eine Öffnung von Calciumkanälen zur Folge hat, scheint hier nicht vorzuliegen (vgl. Abbildung 1-4).

Um zu testen, ob die getroffene Aussage über ANG II und den AT1-Rezeptor zutreffen, wurde noch ein Versuch mit verschiedenen ANG II-Konzentrationen durchgeführt.

Auch bei verschiedenen Konzentrationen kann ANG II nicht die Aufnahme von Ca^{2+} in die Zelle beeinflussen, wie aus Abbildung 4-18 ersichtlich wird. Es fehlt hier zwar der Vergleich zu 3,0 mM Glukose, aber da schon bei den vorherigen Versuchen kein Unterschied festgestellt wurde, ist fragwürdig, ob dieser Vergleich einen interpretatorischen Vorteil birgt.

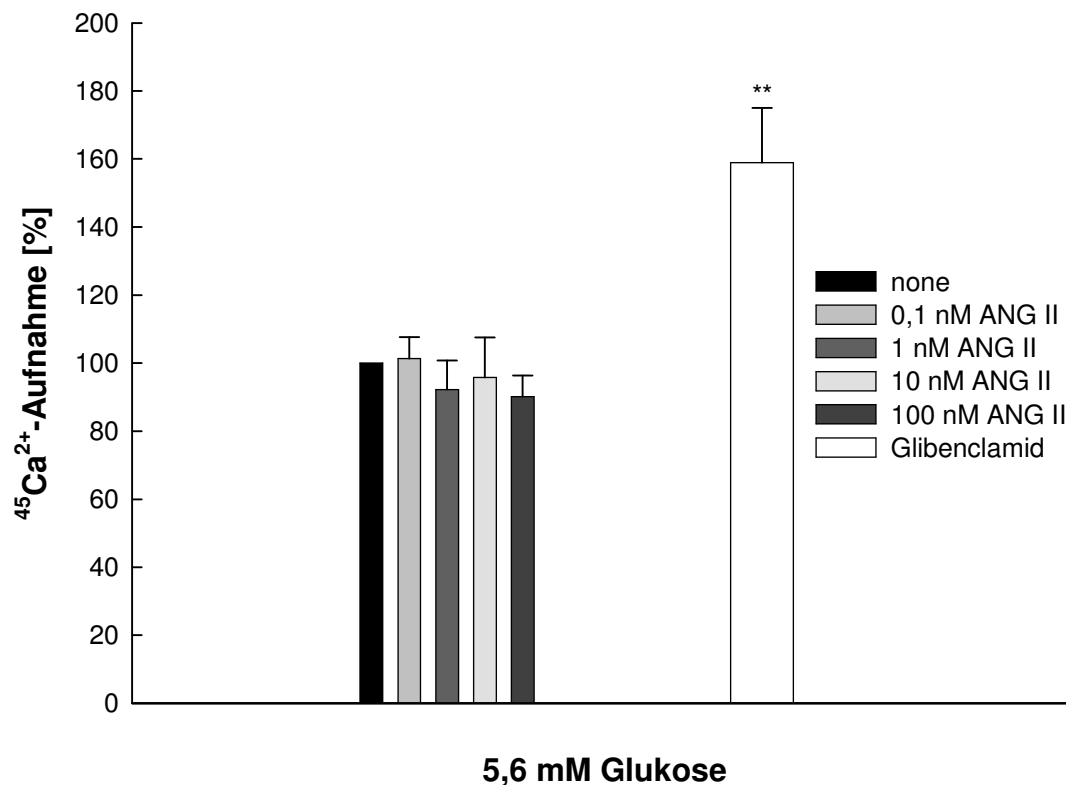


Abbildung 4-18: Effekt von verschiedenen ANG II-Konzentrationen auf die Calciumaufnahme in die Zelle bei 5,6 mM Glukose

n = 6 (unabhängige Versuche durchgeführt als Vierfachbestimmung), \bar{x} + SEM, **: $p \leq 0.01$

5 Diskussion

5.1 ANG II-Bindungsstellen im Pankreas

In der Literatur wurden unterschiedliche Aussagen über die Wirkung von ANG II auf die Insulinsekretion getroffen, weshalb in der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ob ANG II einen steigernden oder hemmenden Effekt auf die Insulinsekretion (glukosestimuliert oder nicht) hat. Trotz der unterschiedlichen Aussagen über die Wirkung von ANG II auf die Insulinsekretion besteht Einigkeit darin, dass ANGII seine Effekte über den AT₁-Rezeptor ausübt. Aus diesem Grund wurde auch in dieser Arbeit versucht, den AT₁-Rezeptor an der untersuchten Insulinomazelllinie INS-1 nachzuweisen.

5.1.1 Immunodetektion

In der hier vorgestellten Arbeit konnte der AT₁-Rezeptor eindeutig durch eine Doppelantikörpermethode im Western Blot an INS-1 Zellen nachgewiesen werden, ebenso wie es schon vorherigen Studien gelungen ist seine Existenz sowohl immunohistochemisch als auch mittels Western Blot an β -Zellen zu belegen.

Als erste Forschergruppe konnten Tahmasebi et al. 1999 den AT₁-Rezeptor eindeutig mit β -Zellen aus humanem Pankreas in Verbindung bringen [114]. Dazu wurden 8 μ m dicke Organschnitte aus humanem Pankreas untersucht. Diese wurden entweder mit einem Primärantikörper gegen Insulin oder den AT₁-Rezeptor inkubiert. Nach weiterer Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper und Amplifikation durch einen Avidin-Biotin Komplex wurden die Schnitte mit Diaminobenzidin gefärbt. Dabei gab es eine positive Färbung für den AT₁-Rezeptor in Zellen der Langerhans'schen Inseln, die eine ähnliche Verteilung aufwiesen wie Zellen, in denen Insulin auf diese Weise angefärbt wurde. Auch immunohistochemisch, mit einer Fluoreszenzmikroskop-gestützten Technik konnten Lau et al. mit einer Doppelfärbemethode den AT₁-Rezeptor an β -Zellen in isolierten Langerhans'schen Inseln von C57BL/6J Mäusen nachweisen [130]. Hierfür wurden die isolierten Inseln mit Paraformaldehyd fixiert und in Parafin eingebettet. Nach gleichzeitiger Inkubation mit einem Primärantikörper gegen den AT₁-Rezeptor oder Insulin und weiterer Inkubation mit einem Sekundärantikörper, spezifisch gegen

einen der Primärantikörper und gekoppelt an Rhodamin oder Aminomethylcoumarinacetat, konnte der AT₁-Rezeptor und Insulin mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Dabei konnte die Lokalisation des AT₁-Rezeptors auf den β -Zellen durch Übereinanderlegen zweier Bilder bei den Anregungs-/Emissionswellenlängen für Rhodamin und Aminomethylcoumarinacetat gezeigt werden. Dieses Ergebnis konnte durch Chu et al. mit derselben Methode, aber an Schnitten des gesamten Pankreas und nicht nur isolierten Inseln, für Typ 2 diabetische C57BL/KSJ db/db Mäuse bestätigt werden [131]. Als Unterschied wurde in dieser Studie durch die diabetische Stoffwechsellage eine Verringerung der Immunoreaktivität für Insulin und eine vermehrte Immunoreaktivität für den AT₁-Rezeptor im Vergleich zur Kontrolle gefunden.

Neben dem immunohistochemischen Nachweis des AT₁-Rezeptors konnten Lau et al. auch mittels Western Blot Analysen seine Anwesenheit in den Langerhans'schen Inseln belegen [130]. Gefunden wurde mit einem Anti-AT₁-Antikörper aus Kaninchen ein 50 kDa schweres Protein, das in seiner Identität als AT₁-Rezeptor dadurch belegt wurde, dass auf gleicher Höhe im Blot eine Bande von einer Präparation aus Mäuseniere gefunden wurde. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Ramracheya et al., die in humanen Inseln und in der Mäuse Insulinomazelllinie MIN6 ein 42,5 kDa schweres Protein als AT₁-Rezeptor durch einen polyklonalen Antikörper aus Kaninchen identifizieren konnten [164].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Immunodetektion stimmen sowohl mit den immunohistochemischen als auch den Western Blot Analysen anderer Forschergruppen überein. Wie bei den Arbeiten von Lau et al. und Ramracheya et al., in denen mittels Western Blot der AT₁-Rezeptor nachgewiesen wurde, wurde auch hier der AT₁-Rezeptor eindeutig über den Vergleich zu einer Präparation aus der Niere derselben Spezies identifiziert. Außerdem stimmt die gefundene relative Molekülmasse für den AT₁-Rezeptor mit 43 kDa sehr genau mit den Ergebnissen von Ramracheya et al. und den für diesen Antikörper vom Hersteller gemachten Angaben überein.

Damit ist dies erst die zweite Arbeit, die mittels Western Blot den AT₁-Rezeptor eindeutig an β -Zellen nachweisen konnte, da ansonsten immer die gesamten Langerhans'schen Inseln und nicht wie in der hier vorgestellten Arbeit einzelne β -Zellen benutzt wurden. Denn eine gesicherte Aussage kann nur durch Nachweis

an einzelnen β -Zellen getroffen werden, auch wenn β -Zellen den Hauptteil der Zellmasse der Langerhans'schen Inseln ausmachen.

5.1.2 Rezeptorbindungsstudien

Die für die nähere Charakterisierung der Rezeptoren von ANG II durchgeführten Bindungsstudien haben zu unerwarteten Ergebnissen geführt.

Wie aus den Kinetikversuchen hervorgeht, weisen INS-1 Zellen nur sehr wenige Bindungsstellen für ANG II auf. Dies wird beim Vergleich von INS-1 Zellen mit den 3T3-L1 Zellen deutlich. Wird durch die 3T3-L1 Zellen ca. 30 % der eingesetzten Radioaktivität gebunden (Daten nicht gezeigt), sind es bei den INS-1 Zellen maximal 3 %, was für eine sehr geringe Anzahl von Bindungsstellen für ANG II und damit Rezeptordichte bei den INS-1 Zellen spricht.

Da es in der Literatur keine Daten zu Rezeptorbindungsstudien an β -Zellen gibt, um die in dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse vergleichen zu können, stellen die hier vorgestellten Ergebnisse die ersten Daten zu einer Bindungsstudie an einer reinen β -Zellkultur dar.

Am ehesten lassen sich die erzielten Ergebnisse mit denen aus den Studien von Chappel et al. und Ghiani et al. vergleichen. Die Forschergruppe um Ghiani konnte 1995 am Pankreas von männlichen Sprague Dawley Ratten einen nanomolaren K_D -Wert für ANG II durch Scatchard Analysen feststellen [123]. Hierfür wurden Sättigungsexperimente an Membranpräparationen des gesamten Pankreas durchgeführt, was neben der Nutzung des gesamten Pankreas noch zwei weitere Unterschiede zu den hier gemachten Untersuchungen darstellt. Trotz dieser Unterschiede wurden aber gleiche Ergebnisse bezüglich der Bindungskinetik gemacht. Nach 20 min war die Bindung von ^{125}I -ANG II am Rezeptor nahezu vollständig, was den hier präsentierten Untersuchungsergebnissen sehr nahe kommt. Nur wurde ^{125}I -ANG II nicht wie in der hier vorgestellten Arbeit anschließend durch enzymatische Prozesse abgebaut.

Durch Chappel et al. wurden die Bindungsstellen für ANG II zum einen am Gesamtpankreas von Mischlingshunden und zum anderen an der pankreatischen Azinuszelllinie AR42J näher charakterisiert [120, 121]. Da in diesen beiden Studien ebenfalls mit Membranpräparationen gearbeitet wurde, lassen sich die Ergebnisse nicht direkt mit dieser Arbeit vergleichen, aber durch Chappel et al. wurden, wie auch in der vorliegenden Arbeit, Verdrängungsstudien durchgeführt. Dabei konnte für ^{125}I -ANG II eine Bindungsstelle in nanomolaren Bereich festgestellt werden. Diese

Bindungsstelle wurde mit den für den AT_2 -Rezeptor spezifischen Rezeptorantagonisten CPG42112A (peptidisch) und L123319 (nicht peptidisch) und Losartan (in den Studien noch DuP753 genannt) näher charakterisiert. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass der Hauptteil der ANG II-Bindungsstellen im Gesamtpankreas und in den AR42J-Zellen, die dem exokrinen Teil des Pankreas zugeordnet werden, AT_2 -Rezeptoren sind. Durch Losartan konnte in beiden Studien nur 10-15 % der Gesamtradioaktivität verdrängt werden. Dieses Erkenntnis könnte eine Erklärung für die gezeigten Ergebnisse mit Losartan an den INS-1 Zellen liefern (Abbildung 4-8). Da durch die Kinetikversuche belegt wurde, dass an INS-1 Zellen nur sehr wenige Bindungsstellen für ANG II vorhanden sind und zusammen mit der Annahme, dass von diesen wenigen Bindungsstellen nur 10-15 % auf den AT_1 -Rezeptor entfallen, ist das eine Erklärung dafür, dass Losartan nur im Insulinsekretionsversuch bei nanomolaren Konzentrationen einen Effekt zeigt, jedoch nicht bei den Bindungsstudien.

Dieser geringe Anteil des AT_1 -Rezeptors an der Gesamtzahl der Bindungsstellen für ANG II könnte zwar eine Erklärung für die fehlenden Effekte von Losartan in den Bindungsstudien an den INS-1 Zellen sein, liefert aber keine Erklärung für das Fehlen einer nanomolaren und damit hochaffinen Bindungsstelle für ANG II an INS-1 Zellen. Dieses außergewöhnliche Phänomen kann wiederum über die sehr geringe Rezeptordichte an den INS-1 Zellen erklärt werden, da der vergleichende Versuch mit den 3T3-L1 Zellen eine, wenn auch nur schwache, Verdrängung im nanomolaren Bereich durch ANG II an Fibroblasten und Losartan an Adipozyten aufweist.

Dies wiederum führt zu einem weiteren Aspekt, der aufgrund der Bindungsstudien diskutiert werden muss. Wie kommt es zu der Verdrängung im mikromolaren Konzentrationsbereich und welche Bedeutung hat diese Bindungsstelle? Eine Erklärung könnte sein, dass hier das nicht markierte ANG II das ^{125}I -ANG II aus nicht spezifischen Bindungen verdrängt. Dem widerspricht aber die Tatsache, dass zumindest an den 3T3-L1 Adipozyten das ^{125}I -ANG II auch durch den nicht peptischen AT_1 -Rezeptorantagonisten Losartan von dieser Bindungsstelle verdrängt wird. Außerdem spricht gegen diese Theorie des Verdrängens aus der nicht spezifischen Bindung die Angabe von Chappel et al. in der Studie zu den AR42J Zellen, da in dieser Untersuchung die maximale nicht spezifische Bindung nur 10 % der Gesamtbindung ausgemacht hat [121]. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass in dieser Studie, in der die Daten der Verdrängungskurven bis zu einer Konzentration

von 100 μM des nicht markierten Liganden gezeigt werden, 90 % des ^{125}I markierten ANG II aus seiner Bindung im nanomolaren Bereich verdrängt werden und nicht nur ca. 20 %, wie es an den 3T3-L1 Zellen der Fall ist. Ein NSB von 10 % wird in der vorgelegten Arbeit nur erreicht, wenn die mikromolare Bindungsstelle mit einbezogen wird.

Auch die Möglichkeit eines weiteren bei dieser Bindungsstudie involvierten Angiotensinrezeptors scheint eher unwahrscheinlich. Zum einen verdrängt, wie bereits erwähnt, Losartan an 3T3-L1 Adipozyten als spezifischer AT_1 -Rezeptorantagonist ^{125}I -ANG II aus dieser Bindung, obwohl Losartan in höheren Konzentrationen auch andere Angiotensinrezeptoren besetzt. Zum anderen könnte dadurch nicht erklärt werden, warum das nur in nanomolaren Konzentrationen eingesetzte ^{125}I -ANG II diesen Rezeptor besetzen sollte, aber dann erst durch mikromolare Mengen nicht markiertem ANG II wieder verdrängt werden kann.

Der einzige, gravierende Unterschied zwischen den mit der hier vorgestellten Arbeit verglichenen Untersuchungen ist, dass in der vorliegenden Arbeit mit lebenden INS-1 und 3T3-L1 Zellen und nicht an Membranpräparationen gearbeitet wurde. Ähnliche Probleme bzgl. einer geringen Verdrängung im nanomolaren Konzentrationsbereich wurden bis jetzt nur von Weiland et al. aus unserer Arbeitsgruppe beschrieben, der ebenfalls mit 3T3-L1 Zellen gearbeitet hat [169]. Ansonsten finden sich in der Literatur keine Angaben zu ähnlichen Phänomenen. Entweder wird mit Membranpräparationen gearbeitet oder wenn Versuche mit lebenden Zellen durchgeführt werden, wird bei höheren Konzentrationen als dem nanomolaren Konzentrationsbereich die Grafik abgeschnitten und keine Angaben über das NSB gemacht. Beispielfhaft sei hier eine Arbeit von Juan et al. genannt, in der eine Verdrängungsstudie an Angiotensinrezeptoren an Adipozyten aus männlichen Sprague-Dawley Ratten durchgeführt wurde [173]. Obwohl sich die Verdrängungskurve nicht asymptotisch der Abszisse annähert, sondern steil darauf zuläuft, endet die Grafik bei einer Konzentration von 10 μM des unmarkierten Liganden. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass gerade der Unterschied des benutzten Zellmaterials eine mögliche Erklärung für die niederaffine Bindungsstelle liefern könnte. Durch positive Kooperation von Proteinen, die sich in der Membran von lebenden Zellen in der Nähe der ANG II-Bindungsstelle befinden, könnte es zu einer Veränderung der Bindungsaffinität der ANG II Bindungsstelle nach Bindung von

¹²⁵I-ANG II kommen. Dies würde erklären, warum erst durch hohe Konzentrationen von nicht markiertem ANG II eine Verdrängung erreicht werden kann.

5.2 Beeinflussung der Insulinsekretion durch ANG II

In den Versuchen zur Beeinflussung der Insulinsekretion durch ANG II konnte deutlich gezeigt werden, dass ANG II bis zu einer Konzentration von 10 nM zu einer dosisabhängigen Steigerung der Insulinsekretion führt (Abbildung 4-11). Obwohl dieser stimulierende Effekt auf die Insulinsekretion durch ANG II nur bei einer Glukosekonzentration von 5,6 mM statistisch signifikant ist, kann er sowohl bei der nicht stimulatorischen Glukosekonzentration von 3,0 mM als auch bei der überstimulatorischen wirkenden Glukosekonzentration von 16,7 mM auch tendenziell erkannt werden und scheint damit unabhängig von der Glukosekonzentration zu sein (Abbildung 4-13, Abbildung 4-14). Durch andere Versuche mit dem spezifischen, nicht peptidischen AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan konnte gezeigt werden, dass Losartan die Steigerung der Insulinsekretion durch ANG II inhibieren kann (Abbildung 4-14). Dies lässt den Schluss zu, dass ANG II die Sekretion von Insulin über den AT₁-Rezeptor steigert. Somit führt ANG II an INS-1 Zellen zu ähnlichen Effekten, wie es auch für das exokrine Pankreas und für das den Blutdruck regulierende RAAS beschrieben ist. Im exokrinen Pankreas steigert ANG II die Sekretion von Verdauungsenzymen und Anionen [136-140] und in der Nebennierenrinde führt es zu einer gesteigerten Sekretion von Aldosteron über denselben Rezeptor.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bzgl. des Einflusses auf die Insulinsekretion stehen zum Teil im Widerspruch zur bestehenden Literatur. Durch Ramracheya et al. wurden Ergebnisse gezeigt, die mit den hier getroffenen Aussagen konform gehen. In dieser Studie wurde an einer Durchflussapparatur gearbeitet und nicht in einem statischen Versuchsaufbau, aber auch in dieser Studie konnte die Insulinsekretion durch das ANG II-Analogon Hypertensin gesteigert werden [164]. Sowohl an humanen Inseln als auch an MIN6 Zellclustern konnte die Insulinsekretion gesteigert und die gesteigerte Insulinsekretion durch eine gleichzeitige Applikation von Losartan wieder normalisiert werden. Deshalb kamen Ramracheya et al. zu der Aussage, dass es über den AT₁-Rezeptor zu einer Steigerung der Insulinsekretion kommt.

Gegenteilige Aussagen zu diesen Ergebnissen werden durch zwei Studien von Huang et al. gemacht. Bei diesen *in vivo* Studien an Wistar Ratten wurde gezeigt, dass durch den ACE-Hemmer Captopril und durch den AT₁-Rezeptorantagonisten

Irbesartan die Insulinplasmaspiegel erhöht werden [161, 162]. Dieses Ergebnis wurde damit begründet, dass durch die RAS-Inhibitoren der pankreatische und im speziellen der Inselblutfluss gesteigert wird und es in diesem Zusammenhang zu einer verbesserten Insulinsekretion kommt.

In einer Studie von Carlsson et al. werden bezüglich des Inselblutflusses und des Einflusses von ANG II auf die Insulinsekretion ähnliche Aussagen getroffen. An perfundierten Inseln konnten Enalapril und SARILE den Inselblutfluss steigern. ANG II hemmte hingegen den Blutfluss und dadurch die Insulinsekretion [127]. Untermuert wurden die getroffenen Aussagen dadurch, dass eine Inkubation mit ANG II 20 min vor der Inkubation mit einer auf die Insulinsekretion stimulatorisch wirkenden Glukosekonzentration keine Auswirkungen auf die Insulinsekretion hatte. Dies wiederum wurde damit begründet, dass in dieser Versuchsanordnung die ANG II-induzierte Vasokonstriktion schon vorüber war als die Glukosestimulation begann und es deshalb zu einer normalen Insulinfreisetzung kam.

Ebenfalls konträre Aussagen zu den hier präsentierten Ergebnissen wurden durch Chu et al. und Lau et al. gemacht. In diesen beiden Studien wurde, vergleichbar mit der Versuchsanordnung in dieser Arbeit, in einem statischen System gearbeitet, bei dem ganze Inseln zuerst 60 min mit 1,7 mM Glukose und dann 60 min mit 16,7 mM Glukose inkubiert wurden. Durch eine gleichzeitige Inkubation von ANG II und 16,7 mM Glukose wurden sowohl die Insulinsekretion als auch die (Pro-)Insulinbiosynthese gehemmt [130, 131]. Diese Hemmung konnte durch Losartan (1 μ M), aber nicht durch PD123319 wieder aufgehoben werden. Diese durch Lau et al. 2004 an C57BL/6J Mäusen gezeigten Ergebnisse, konnten zwei Jahre später von Chu et al. an C57BL/KSJ db/db Mäusen, die ein Modell für T2DM darstellen, bestätigt werden.

Widersprüche in den Versuchsergebnissen zur durch ANG II beeinflussten Insulinsekretion können auch durch unterschiedliche Versuchsanordnungen bedingt sein: Möglichkeit der Akkumulation von Somatostatin oder nicht. Der Unterschied zwischen diesen beiden Untersuchungen und der hier vorgestellten Arbeit liegt neben den gegensätzlichen Ergebnissen auch in der Auswahl des Untersuchungsmaterials. Wurde in der hier vorgestellten Arbeit mit INS-1 Zellen gearbeitet, was die Messung isolierter Effekte an der β -Zelle zulässt, so wurden in den Studien von Lau et al. und Chu et al. ganze Inseln verwendet. Dabei ist zu bedenken, dass es in Langerhans'schen Inseln neben den Insulin produzierenden

und sezernierenden β -Zellen auch noch andere Zelltypen gibt, die parakrine Effekte hervorrufen. Besonders erwähnenswert sind hier die SST produzierenden δ -Zellen. Denn Wong et al. konnten zeigen, dass ANG II dosisabhängig die SST-Sekretion steigern kann [174]. Parakrin freigesetztes SST würde die Insulinsekretion hemmen. In der Studie von Wong et al. wurden RIN-14B Zellen ebenfalls in einem statischen Versuchsaufbau untersucht und dabei ergab sich bei einer Konzentration von 1 μ M für ANG II ein Maximum der Steigerung der SST-Sekretion.

SST kann sowohl die Insulinsekretion als auch die Insulinbiosynthese hemmen. An HIT-T15 Zellen, einer Insulin sezernierenden Inselzelllinie aus dem Hamster, konnte SST nicht nur die Insulinsekretion, sondern auch dosis- und zeitabhängig die mRNA-Expression für Insulin vermindern [175]. SST vermindert die mRNA-Expression in dem Maße, wie es die Gentranskription selbst verhindert. Dieser Zusammenhang wurde unter Verwendung der CAT-Reporter Technik hergestellt [176].

Über welchen Rezeptor SST diese Effekte auf die Insulinsekretion und -biosynthese ausübt, ist noch nicht vollständig geklärt bzw. scheint in unterschiedlichen Spezies verschieden zu sein. In Mäusen wurde durch ein STTR^{LX2}- [177] und ein STTR5-knock out Modell [178] die Verminderung der Insulinsekretion über den SSTR5 nachgewiesen. Ebenso konnte in Inseln von Ratten durch eine Doppelfärbemethode eine Colokalisation von Insulin und dem SSTR5 belegt werden [179]. In den oben schon aufgeführten HIT-T15 Zellen hingegen konnte eine Hemmung der Insulinsekretion nur mit dem SSTR2 spezifischen, nicht peptidischen Agonisten L-779976 gezeigt werden. Trotz Unklarheiten bzgl. des Rezeptorsubtypen kommt man zusammenfassend zu der Aussage, dass SST sowohl die Insulinsekretion als auch die Insulinbiosynthese hemmt.

Dies ist eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse, die es in den verschiedenen Untersuchungen zum Einfluss von ANG II auf die Insulinsekretion gibt. In der hier vorgestellten Arbeit wurde durch die Versuche an INS-1 Zellen der alleinige Effekt von ANG II auf β -Zellen untersucht und damit ein eventueller Effekt von SST auf die Insulinsekretion sicher ausgeschlossen. In der Untersuchung von Ramracheya et al., in der Versuche an einer Durchflusszelle mit Inseln durchgeführt wurden, konnte durch ANG II evtl. verstärkt sezerniertes SST aufgrund des

^{LX} SSTR: Somatostatinrezeptor

Versuchsaufbaus und der kurzen Inkubationszeit mit ANG II wahrscheinlich nicht die Insulinsekretion inhibieren. Nur bei den Untersuchungen von Lau et al. und Chu et al. konnte durch die 60-minütige Inkubation von ganzen Inseln in einem statischen Versuchssystem das durch ANG II verstärkt ausgeschüttete SST parakrin die Insulinsekretion und, wie auch in diesen Untersuchungen festgestellt, die (Pro-)Insulinbiosynthese hemmen.

Was gegen diese Argumentation spricht ist die Tatsache, dass durch Wong et al. festgestellt wurde, dass der AT_2 -Rezeptor und nicht der AT_1 -Rezeptor für die Steigerung der SST-Sekretion verantwortlich ist. Dies wiederum bedeutet, dass es in den Studien von Lau et al. und Chu et al. zu einer Normalisierung der Insulinsekretion durch eine AT_2 -Rezeptorblockade und nicht durch Losartan hätte kommen müssen. Dazu ist zu sagen, dass es von Wong et al. nur eine Untersuchung gibt, die sich mit ANG II und seinen Rezeptoren an δ -Zellen beschäftigt. In der Studie von Wong et al. wurde die ANG II stimulierte SST-Sekretion auch durch Losartan in der Konzentration 1 μ M normalisiert, wie sie auch von Chu et al. und Lau et al. eingesetzt worden ist. Des Weiteren wurden zwei verschiedene AT_2 -Rezeptorantagonisten verwendet, CPG42112 (peptidisch) von Wong et al. und PD123319 (nicht peptidisch) von Chu et al. und Lau et al. Auch die Auswahl der Substanzen könnte theoretisch einen Unterschied ausmachen.

Aufgrund der Tatsache, dass es durch Wong et al. erst eine Studie zu dem Thema SST-Sekretion gibt, sollte die oben aufgeführte Überlegung nicht verworfen werden, da sie einen möglichen Zusammenhang für die unterschiedlichen Ergebnisse, die es bzgl. des Einflusses von ANG II auf die Insulinsekretion gibt, darstellt. Ferner ist es eher ungewöhnlich, dass es über den AT_2 -Rezeptor und nicht über den AT_1 -Rezeptor zu einer Sekretionssteigerung kommt. Denn auch in anderen Teilen des Pankreas konnte gezeigt werden, dass ANG II Sekretionsvorgänge über den AT_1 -Rezeptor beeinflusst, obwohl der AT_2 -Rezeptor teilweise sogar prädominant vorkommt [121].

Ein weiteres Ergebnis der Sekretionsversuche ist die Steigerung der Insulinsekretion durch den unspezifischen, partiellen ANG II-Rezeptoragonisten SARILE (Abbildung 4-12). Er konnte wie ANG II die Insulinsekretion dosisabhängig steigern, nur wurde die maximale Steigerung der Insulinsekretion erst bei einer Konzentration von 100 nM erreicht, was eine zehnfach höhere Konzentration als bei ANG II darstellt. Dies zeigt zum einen, dass SARILE durch seine strukturelle Veränderung, die das

Molekül weniger anfällig für proteolytischen Abbau macht, etwas an Affinität zum AT_1 -Rezeptor verloren hat, zum anderen wird dadurch deutlich, dass SARILE hier als Agonist wirkt. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass INS-1 Zellen kein ANG II produzieren, welches dann autokrin stimulatorisch auf die Insulinsekretion wirkt, da es sonst zu einer Hemmung der Insulinsekretion durch SARILE hätte kommen müssen.

5.3 Beeinflussung der intrazellulären Calciumkonzentration durch ANG II

Ferner sollte untersucht werden, ob es durch ANG II zu einem vermehrten Influx von Ca^{2+} und dadurch zu der erhöhten Insulinsekretion kommt, wie sie in den Sekretionsversuchen festgestellt werden konnte. Bisher gibt es ähnlich wie bei den Bindungsstudien mit ANG II nur eine Studie bzgl. des Einflusses von ANG II auf die intrazelluläre Calciumkonzentration bei β -Zellen. In den Untersuchungen von Ramracheya et al. wurde festgestellt, dass ANG II die intrazelluläre Calciumkonzentration sowohl durch einen PLC sensitiven Mechanismus als auch durch spannungsabhängige Calciumkanäle erhöht [164]. Dafür wurden mit Fura-2 beladene humane β -Zellen und MIN6 Zellen mit Hypertensin, einem ANG II-Analogen, in einer Durchflusszelle inkubiert. Es ergab sich eine dosisabhängige Steigerung der, durch die Reaktion von Fura-2 mit Ca^{2+} ausgelösten, Fluoreszenz. Diese Fluoreszenzsteigerung konnte zum einen durch den Calciumkanalmodulator Nifedipin und zum anderen durch den PLC-Inhibitor U73122 nur teilweise gehemmt werden. Deshalb wurde durch Ramracheya et al. davon ausgegangen, dass es durch den AT_1 -Rezeptor und einen G_q -gekoppelten Mechanismus zur Aktivierung der PLC und dann zur Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} und über einen anderen, nicht näher untersuchten, Weg zum Influx von Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum über L-Typ-Calciumkanäle kommt.

Die Ergebnisse von Ramracheya et al. konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Dies liegt zum einen an den Ergebnissen selber, zum anderen möglicherweise an der abweichenden Methode. In dieser Arbeit wurde nur die Aufnahme von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aus dem Extrazellularraum untersucht. Es konnte zwar erwartungsgemäß gezeigt werden, dass es durch Veränderung der Glukosekonzentration auf eine die Insulinsekretion stimulierende Konzentration zu einem vermehrten Influx von Ca^{2+} kommt (Abbildung 4-15), aber dieser Influx konnte durch keine der getesteten ANG II-Konzentrationen weiter gesteigert werden (Abbildung 4-16, Abbildung 4-17, Abbildung 4-18). Dies führt zu dem Schluss, dass ANG II an INS-1 Zellen seinen insulinsekretionsfördernden Effekt nicht über Beeinflussung von Calciumkanälen und vermehrten Calciumeinstrom sondern über

den für den AT₁-Rezeptor klassischen Weg einer G_q-Kopplung und Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER ausübt.

Dieses Ergebnis ist nicht sehr außergewöhnlich, da es auch in anderen Zelllinien unterschiedliche Ergebnisse bzgl. der Beeinflussung der intrazellulären Calciumkonzentration durch ANG II gibt. So zeigte sich in einer Studie von Wennemuth et al. an mit Fura-2 beladenen hCPC (human primary cultures of the prostate stromal compartment) Zellen durch eine lokale Perfusion mit ANG II in der Konzentration von 10 nM ein spontaner und linearer Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Durch Entfernen des extrazellulären Calciums oder durch Entleeren der intrazellulären Calciumspeicher vor der Applikation von ANG II verminderte sich die Erhöhung des intrazellulären Calciums oder wurde vollständig inhibiert [180].

In einer Studie von Chan et al. hingegen konnte an CFPAC-1 Zellen, einer Zelllinie die ein Modell für die zystische Fibrose darstellt, mit Hilfe einer ISC-Technik gezeigt werden, dass sich der ISC sowohl durch apikale als auch basolaterale Applikation von ANG II dosisabhängig steigern lässt. Diese Steigerung des ISC konnte aber nur durch Entleerung des intrazellulären und nicht des extrazellulären Calciumpools erreicht werden [135].

Nicht erklärt werden kann hingegen das Ausbleiben der Erhöhung der Calciumaufnahme durch die, auf die Insulinsekretion stimulierend wirkende, Glukosekonzentration von 5,6 mM. Mögliche Erklärungen über eine Nichtstimulation des Calciuminfluxes bei einer Konzentration von 5,6 mM Glukose oder einer Maximalstimulation schon bei 3,0 mM Glukose scheinen wenig sinnvoll, da es bei den Untersuchungen zur Insulinsekretion wie erwartet einen deutlichen Unterschied in der Stimulation der Insulinsekretion durch die beiden unterschiedlichen Glukosekonzentrationen gab. Da es außerdem durch vermehrte Glukoseaufnahme in die β-Zelle zu einer vermehrten Bildung von ATP, Schließung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen und zur Depolarisation kommt, die eine Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen zur Folge hat, kann auch nicht mit einer Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern argumentiert werden, was zu einer Sekretionssteigerung führen würde.

5.4 Ausblick

Durch die Ergebnisse in der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass ANG II über den AT₁-Rezeptor die Insulinsekretion steigert. Doch trotz dieser gesicherten Aussage bleibt die Interpretation von einigen der vorgestellten Ergebnisse unklar. Dieser Umstand und die widersprüchlichen Aussagen zu diesem Thema in der Literatur zeigen, dass zur Beantwortung dieser und weiterer Fragen viele klärende Versuche nötig sind.

So könnte eine Western Blot Untersuchung zeigen, ob neben dem AT₁- auch der AT₂-Rezeptor, wie auch schon in anderen Teilen des Pankreas, vorhanden ist. Falls dies der Fall sein sollte, wäre ein Verhältnisabgleich interessant um zu sehen, ob auch hier der AT₂-Rezeptor prädominant vorliegt, die Wirkung von ANG II aber nur über den AT₁-Rezeptor erfolgt, wie es auch schon für den exokrinen Teil des Pankreas beschrieben ist.

Bei den Verdrängungsversuchen könnten weitere Experimente an Rezeptoren, die durch eine Membranpräparation aufkonzentriert worden sind, durchgeführt werden, um zum einen eine höhere spezifische Bindung zu erreichen und zum anderen um die Frage zu klären, ob ein Unterschied darin besteht, Bindungsstudien an ganzen Zellen oder an Rezeptoren einer Membranpräparation zu machen. Außerdem könnten Verdrängungsstudien mit PD123319 oder CPG41221 als AT₂-Rezeptor selektive Substanzen von Interesse sein, falls in den Western Blot Untersuchungen der AT₂-Rezeptor gefunden wurde.

Der Großteil der weiterführenden Versuche sollte bei den Experimenten zur Insulinsekretion durchgeführt werden, um die vielen verschiedenen Aussagen zu einem logischen Gesamtbild zusammenfügen zu können. Deshalb sollten zur Untermauerung der SST-Theorie Sekretionsversuche mit ANG II und SST gemacht werden, um zu sehen, ob es trotz der Stimulation der Sekretion durch ANG II zu einer Abnahme der Gesamtsekretion über eine Inkubationszeit von 60-90 min bei gleichzeitiger Inkubation mit SST kommt. Falls diese Versuche erwartete Ergebnisse liefern, könnten sich daran Untersuchungen an Langerhans'schen Inseln anschließen. Hier müsste nochmals getestet werden, ob die Sekretionssteigerung von SST wirklich über den AT₂-Rezeptor abläuft. Dies sollte mit Hilfe von Losartan und PD123319 geschehen, da diese Substanzen in den Studien von Chu et al. und

Lau et al., in denen eine Hemmung der Insulinsekretion gezeigt werden konnte, Verwendung fanden. Weiter müsste getestet werden, ob es durch eine gleichzeitige Inkubation mit ANG II und einem SSTR-Antagonisten an Langerhans'schen Inseln zu einer Sekretionssteigerung und nicht zu einer Hemmung kommt.

Um zu klären wie die Postrezeptorkaskade des AT₁-Rezeptors in INS-1 Zellen abläuft, könnte man versuchen, die wahrscheinliche G_q-Kopplung des AT₁-Rezeptors mit Pertussistoxin oder PLC mit U73122 zu blockieren und damit die Postrezeptorkaskade bei einem Ausbleiben der Sekretionssteigerung auf diese Weise näher zu charakterisieren.

Bei den Versuchen mit ⁴⁵Ca²⁺ sollte nachträglich nochmals geklärt werden, warum es durch Glukose in der Konzentration von 5,6 mM zu keiner Zunahme des Calciuminfluxes kam. Ansonsten sollte dieser Ansatz verlassen und stattdessen versucht werden, die intrazellulären Veränderungen der Calciumkonzentration mit einem fluoreszenzbasierenden System und mit Fura-2 oder Indo-1 beladenen Zellen zu untersuchen. Bei dieser Methode sollten dann alle oben genannten Substanzen zur Bestätigung der Ergebnisse aus den Sekretionsversuchen eingesetzt werden.

6 Zusammenfassung

6.1 Ergebnisse

- Der AT₁-Rezeptor konnte durch die Western Blot Untersuchungen und dem Vergleich mit Nierengewebe aus Wistar Ratten und 3T3-L1 Zellen an INS-1 Zellen nachgewiesen werden.
- In den Versuchen zur Bindungskinetik an INS-1 Zellen zeigten sich nur sehr wenige Bindungsstellen für ANG II.
- ¹²⁵Iod markiertes ANG II konnte nur im mikromolaren Bereich durch nichtmarkiertes ANG II an INS-1 Zellen verdrängt werden.
- Sarile zeigte in den Verdrängungsversuchen ein ähnliches Verhalten wie ANG II, hatte aber einen fünffach höheren K_D-Wert.
- Losartan alleine konnte ¹²⁵Iod markiertes ANG II nicht aus seiner Bindung an INS-1 Zellen verdrängen, verschob aber mit ANG II zusammen inkubiert die Bindungskurve um eine halbe Zehnerpotenz nach links.
- An 3T3-L1 Adipozyten zeigte Losartan einen biphasischen Kurvenverlauf bei der Verdrängung von ¹²⁵Iod markiertem ANG II mit einer nanomolaren und einer mikromolaren Bindungsstelle.
- ANG II steigerte bis zu einer Konzentration von 10 nM dosisabhängig die durch 5,6 mM Glukose stimulierte Insulinsekretion.
- Sarile steigerte bis zu einer Konzentration von 100 nM dosisabhängig die durch 5,6 mM Glukose stimulierte Insulinsekretion, aber in einem geringeren Ausmaß als ANG II.
- ANG II in der Konzentration 1 nM steigerte bei einer Glukosekonzentration von 5,6 mM signifikant und auch bei nicht- oder überstimulierenden Glukosekonzentrationen tendenziell die Insulinsekretion
- Die durch ANG II stimulierte Insulinsekretion konnte durch Losartan gehemmt werden.
- Durch ANG II kam es an INS-1 Zellen nicht zu einem erhöhten Influx von Ca²⁺ aus dem Extrazellularraum in die Zelle.

6.2 Schlussfolgerungen

In den Western Blot Untersuchungen konnte der AT₁-Rezeptor zwar nachgewiesen werden, doch ergab sich aus den Versuchen zur Bindungskinetik eine nur sehr geringe Rezeptordichte. Dies konnte durch die Verdrängungsversuche mit Losartan noch weiter differenziert werden, da es durch Losartan alleine zu keiner Verdrängung und durch Inkubation von Losartan mit ANG II nur zu einer geringen Linksverschiebung der Verdrängungskurve kam. Dieses Ergebnis macht das Vorhandensein und eine Prädominanz des AT₂-Rezeptors in INS-1 Zellen sehr wahrscheinlich.

Durch die Ergebnisse der Verdrängungsversuche mit der alleinigen Verdrängung von ¹²⁵I-ANG II an INS-1 Zellen und einem Großteil der Verdrängung an 3T3-L1 Zellen im mikromolaren Bereich ist ein Unterschied zwischen Verdrängungsstudien an ganzen Zellen und Membranpräparationen sehr wahrscheinlich und lässt eine Interaktion von cytosolischen Proteinen mit dem Ligand/Rezeptorkomplex vermuten.

Da bei der Untersuchung des Einflusses von ANG II auf die Insulinsekretion INS-1 Zellen und nicht ganze Inseln oder das gesamte Pankreas genutzt wurden, kann die eindeutige Aussage getroffen werden, dass es durch ANG II an β -Zellen zu einer gesteigerten Insulinsekretion kommt, weil eventuelle Störungen durch Durchblutungsschwankungen oder durch andere Zellen sezernierte, parakrin wirkende Substanzen ausgeschlossen sind. Außerdem steigert ANG II an INS-1 Zellen die Insulinsekretion über den AT₁-Rezeptor, da die gesteigerte Insulinsekretion durch Losartan wieder normalisiert wird.

Sarile hat eine steigernde Wirkung auf die Insulinsekretion. Diese Sekretionssteigerung fiel nicht so hoch aus wie bei ANG II, da Sarile nur ein partieller Agonist/Antagonist am AT₁-Rezeptor ist. Dadurch konnte gleichermaßen gezeigt werden, dass INS-1 Zellen kein ANG II selbst produzieren, welches autokrin die Insulinsekretion steigert, da es sonst durch Sarile zu einer Hemmung der Insulinsekretion hätte kommen müssen.

Als Resümee der Versuche mit ⁴⁵Ca²⁺ bleibt festzuhalten, dass es durch ANG II nicht zu einem erhöhten Influx von Ca²⁺ aus dem Extrazellularraum in die INS-1 Zellen kommt. Die Versuche sind allerdings deshalb vorsichtig zu interpretieren, da die Glukose als Positiv-Kontrolle nicht gut funktionierte. Deswegen kann davon

ausgegangen werden, dass der AT₁-Rezeptor an INS-1 Zellen, über den ANG II wirkt, klassisch G_q-gekoppelt ist. Dadurch kommt es durch ANG II zu einer Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Ca²⁺ und einer gesteigerten Insulinsekretion, wobei der genaue Mechanismus noch weiter untersucht werden muss.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Stimulations-Sekretions-Kopplung und Elektrolyttransport aus der Azinuszelle in den Ausführungsgang des Pankreas.	4
Abbildung 1-2: Signalkaskade für die Insulinsekretion und Modulationsmechanismen	10
Abbildung 1-3: Aminosäuresequenz und Sekundärstruktur des Säugetier-AT ₁ -Rezeptors	12
Abbildung 1-4: Signaltransduktion des AT ₁ -Rezeptors	14
Abbildung 1-5: Darstellung der Bildung der Angiotensinpeptide	25
Abbildung 1-6: Physiologische und pathophysiologische Rezeptorkopplung des AT ₁ -Rezeptors im exokrinen Pankreas	35
Abbildung 1-7: Auswirkung der Aktivierung des AT ₁ -Rezeptors bei T2DM im endokrinen Pankreas	38
Abbildung 4-1: Western Blot Analyse von INS-1 Zellen	71
Abbildung 4-2: Western Blot von 3T3-L1 Zellen	72
Abbildung 4-3: Zeitlicher Verlauf der Bindung von [¹²⁵ I]-ANG II an INS-1 Zellen über 210 min	74
Abbildung 4-4: Zeitlicher Verlauf der Bindung von [¹²⁵ I]-ANG II an INS-1 Zellen über 60 min	75
Abbildung 4-5: Zeitlicher Verlauf der Bindung von [¹²⁵ I]-ANG II an 3T3-L1 Zellen über 210 min	76
Abbildung 4-6: Verdrängung von [¹²⁵ I]-ANG II durch ANG II an INS-1 Zellen	78
Abbildung 4-7: Verdrängung von [¹²⁵ I]-ANG II durch Sarile an INS-1 Zellen	79
Abbildung 4-8 Verdrängung von [¹²⁵ I]-ANG II durch ANG II + 1 µM Losartan an INS-1 Zellen	80
Abbildung 4-9: Verdrängung von [¹²⁵ I]-ANG II durch ANG II an 3T3-L1 Fibroblasten	81
Abbildung 4-10: Verdrängung von [¹²⁵ I]-ANG II durch Losartan an 3T3-L1 Adipozyten	82
Abbildung 4-11: Effekt von ANG II auf die glukosestimulierte Insulinsekretion bei INS-1 Zellen	84
Abbildung 4-12 Effekt von SARILE auf die glukosestimulierte Insulinsekretion bei INS-1 Zellen	85
Abbildung 4-13: Effekt von ANG II auf die glukosestimulierte Insulinsekretion bei verschiedenen Glukosekonzentrationen	86
Abbildung 4-14: Effekt von ANG II und Losartan auf die glukosestimulierte Insulinsekretion	87
Abbildung 4-15: Effekt unterschiedlicher Glukosekonzentrationen auf die zeitabhängige Calciumaufnahme	89
Abbildung 4-16: Effekt von ANG II bei verschiedenen Glukosekonzentrationen auf die Calciumaufnahme in die Zelle nach 5 min	90
Abbildung 4-17: Effekt von ANG II bei verschiedenen Glukosekonzentrationen auf die Calciumaufnahme in die Zelle nach 2,5 min	91
Abbildung 4-18: Effekt von verschiedenen ANG II-Konzentrationen auf die Calciumaufnahme in die Zelle bei 5,6 mM Glukose	92

Tabelle 1-1: Enzyme des Pankreassaftes mit ihren Substraten, Funktionen und Spaltprodukten	3
Tabelle 1-2: Verteilung verschiedener Komponenten des pankreatischen RAS in unterschiedlichen Spezies und Zellkulturen	31
Tabelle 1-3: Einfluss von ANG II und verschiedener Arzneistoffe/Modellsubstanzen auf die Insulinsekretion und der damit verbundenen Stoffwechselwege	41

8 Literaturverzeichnis

1. Thews, G., E. Mutschler, and P. Vaupel, *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. 1999. **5**: p. 371-375.
2. Kojima, S., et al., *A role for pancreatic polypeptide in feeding and body weight regulation*. *Peptides*, 2007. **28**(2): p. 459-63.
3. De Vriese, C. and C. Delporte, *Ghrelin: A new peptide regulating growth hormone release and food intake*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007.
4. Cummings, D.E., et al., *Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome*. *Nat Med*, 2002. **8**(7): p. 643-4.
5. Foster, C.M., et al., *Ghrelin Concentrations Reflect Body Mass Index Rather Than Feeding Status in Obese Girls*. *Pediatr Res*, 2007. **62**(6): p. 731-734.
6. de Gasparo, M., et al., *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(3): p. 415-72.
7. Macrez, N., et al., *A betagamma dimer derived from G13 transduces the angiotensin AT1 receptor signal to stimulation of Ca²⁺ channels in rat portal vein myocytes*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(37): p. 23180-5.
8. Klett, C., et al., *Angiotensin II stimulates the synthesis of angiotensinogen in hepatocytes by inhibiting adenylylcyclase activity and stabilizing angiotensinogen mRNA*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(33): p. 25095-107.
9. Venema, R.C., et al., *Angiotensin II-induced association of phospholipase Cgamma1 with the G-protein-coupled AT1 receptor*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(13): p. 7703-8.
10. Ali, M.S., et al., *Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(37): p. 23382-8.
11. Marrero, M.B., et al., *Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor*. *Nature*, 1995. **375**(6528): p. 247-50.
12. Clark, A.J., et al., *Stimulation of early gene expression by angiotensin II in bovine adrenal glomerulosa cells: roles of calcium and protein kinase C*. *Mol Endocrinol*, 1992. **6**(11): p. 1889-98.
13. Sadoshima, J., et al., *Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling*. *Circ Res*, 1995. **76**(1): p. 1-15.
14. Liao, D.F., et al., *Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(10): p. 6146-50.
15. Schieffer, B., et al., *Angiotensin II controls p21ras activity via pp60c-src*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(17): p. 10329-33.
16. Tian, Y., et al., *Growth responses to angiotensin II in bovine adrenal glomerulosa cells*. *Am J Physiol*, 1995. **268**(1 Pt 1): p. E135-44.
17. Hunyady, L., et al., *Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(50): p. 31378-82.

18. Iwai, N. and T. Inagami, *Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor*. FEBS Lett, 1992. **298**(2-3): p. 257-60.
19. Gasc, J.M., et al., *Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study*. Hypertension, 1994. **24**(5): p. 531-7.
20. Shanmugam, S., P. Corvol, and J.M. Gasc, *Ontogeny of the two angiotensin II type 1 receptor subtypes in rats*. Am J Physiol, 1994. **267**(6 Pt 1): p. E828-36.
21. Yoshida, H., et al., *Analysis of the evolution of angiotensin II type 1 receptor gene in mammals (mouse, rat, bovine and human)*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **186**(2): p. 1042-9.
22. Kuroda, S., et al., *Novel subtype of human angiotensin II type 1 receptor: analysis of signal transduction mechanism in transfected Chinese hamster ovary cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **199**(2): p. 475-81.
23. Curnow, K.M., et al., *Alternatively spliced human type 1 angiotensin II receptor mRNAs are translated at different efficiencies and encode two receptor isoforms*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(9): p. 1250-62.
24. Kambayashi, Y., et al., *Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition*. J Biol Chem, 1993. **268**(33): p. 24543-6.
25. Grady, E.F., et al., *Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus*. J Clin Invest, 1991. **88**(3): p. 921-33.
26. Shanmugam, S., et al., *Ontogeny of angiotensin II type 2 (AT2) receptor mRNA in the rat*. Kidney Int, 1995. **47**(4): p. 1095-100.
27. Huang, X.C., C. Sumners, and E.M. Richards, *Angiotensin II stimulates protein phosphatase 2A activity in cultured neuronal cells via type 2 receptors in a pertussis toxin sensitive fashion*. Adv Exp Med Biol, 1996. **396**: p. 209-15.
28. Horiuchi, M., M. Akishita, and V.J. Dzau, *Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis*. Endocr Res, 1998. **24**(3-4): p. 307-14.
29. Gallinat, S., et al., *AT2 receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells*. FEBS Lett, 1999. **443**(1): p. 75-9.
30. Kohout, T.A. and T.B. Rogers, *Angiotensin II activates the Na⁺/HCO₃⁻ symport through a phosphoinositide-independent mechanism in cardiac cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(35): p. 20432-8.
31. Masaki, H., et al., *Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects*. J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 527-35.
32. Tsutsumi, Y., et al., *Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation*. J Clin Invest, 1999. **104**(7): p. 925-35.
33. Hein, L., et al., *Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice*. Nature, 1995. **377**(6551): p. 744-7.
34. Siragy, H.M. and R.M. Carey, *Protective role of the angiotensin AT2 receptor in a renal wrap hypertension model*. Hypertension, 1999. **33**(5): p. 1237-42.
35. AbdAlla, S., et al., *The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 39721-6.
36. Zhang, J.H., et al., *Structural analysis of angiotensin IV receptor (AT4) from selected bovine tissues*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **289**(2): p. 1075-83.
37. Mustafa, T., et al., *Characterization of the AT(4) receptor in a human neuroblastoma cell line (SK-N-MC)*. J Neurochem, 2001. **76**(6): p. 1679-87.
38. Albiston, A.L., et al., *Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase*. J Biol Chem, 2001. **276**(52): p. 48623-6.

39. Laustsen, P.G., et al., *The complete amino acid sequence of human placental oxytocinase*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1352**(1): p. 1-7.
40. Tsujimoto, M., et al., *Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase*. *Arch Biochem Biophys*, 1992. **292**(2): p. 388-92.
41. Lew, R.A., et al., *Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP)*. *J Neurochem*, 2003. **86**(2): p. 344-50.
42. de Wied, D., M. Diamant, and M. Fodor, *Central nervous system effects of the neurohypophyseal hormones and related peptides*. *Front Neuroendocrinol*, 1993. **14**(4): p. 251-302.
43. Engelmann, M., et al., *Behavioral consequences of intracerebral vasopressin and oxytocin: focus on learning and memory*. *Neurosci Biobehav Rev*, 1996. **20**(3): p. 341-58.
44. Stragier, B., et al., *Involvement of the somatostatin-2 receptor in the anti-convulsant effect of angiotensin IV against pilocarpine-induced limbic seizures in rats*. *J Neurochem*, 2006. **98**(4): p. 1100-13.
45. Stragier, B., et al., *Involvement of insulin-regulated aminopeptidase and/or aminopeptidase N in the angiotensin IV-induced effect on dopamine release in the striatum of the rat*. *Brain Res*, 2007. **1131**(1): p. 97-105.
46. Stragier, B., et al., *Metabolism of angiotensin II is required for its in vivo effect on dopamine release in the striatum of the rat*. *J Neurochem*, 2004. **90**(5): p. 1251-7.
47. Jackson, T.R., et al., *The mas oncogene encodes an angiotensin receptor*. *Nature*, 1988. **335**(6189): p. 437-40.
48. Walther, T., et al., *Altered heart rate and blood pressure variability in mice lacking the Mas protooncogene*. *Braz J Med Biol Res*, 2000. **33**(1): p. 1-9.
49. Von Bohlen und Halbach, O., et al., *Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala*. *J Neurophysiol*, 2000. **83**(4): p. 2012-21.
50. Kostenis, E., et al., *G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor*. *Circulation*, 2005. **111**(14): p. 1806-13.
51. Santos, E.L., et al., *Functional rescue of a defective angiotensin II AT1 receptor mutant by the Mas protooncogene*. *Regul Pept*, 2007. **141**(1-3): p. 159-67.
52. Hackenthal, E., et al., *Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion*. *Physiol Rev*, 1990. **70**(4): p. 1067-116.
53. Persson, P.B., A. Skälweit, and B.J. Thiele, *Controlling the release and production of renin*. *Acta Physiol Scand*, 2004. **181**(4): p. 375-81.
54. Suzuki, F., et al., *Human prorenin has "gate and handle" regions for its non-proteolytic activation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(25): p. 22217-22.
55. Ichihara, A., et al., *Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(8): p. 1128-35.
56. Danser, A.H., et al., *Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis*. *Hypertension*, 1994. **24**(1): p. 37-48.
57. van Kesteren, C.A., et al., *Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts*. *J Mol Cell Cardiol*, 1997. **29**(8): p. 2147-57.

58. Nguyen, G., C.A. Burckle, and J.D. Sraer, *Renin/prorenin-receptor biochemistry and functional significance*. *Curr Hypertens Rep*, 2004. **6**(2): p. 129-32.
59. Jan Danser, A.H. and J.J. Saris, *Prorenin uptake in the heart: a prerequisite for local angiotensin generation?* *J Mol Cell Cardiol*, 2002. **34**(11): p. 1463-72.
60. Takahashi, S., et al., *Human renin-binding protein is the enzyme N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase*. *J Biochem (Tokyo)*, 1999. **125**(2): p. 348-53.
61. Takahashi, S., et al., *Purification of high molecular weight (HMW) renin from porcine kidney and direct evidence that the HMW renin is a complex of renin with renin binding protein (RnBP)*. *J Biochem (Tokyo)*, 1983. **93**(1): p. 265-74.
62. Schmitz, C., et al., *Normal blood pressure and plasma renin activity in mice lacking the renin-binding protein, a cellular renin inhibitor*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(20): p. 15357-62.
63. Nguyen, G., et al., *Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(11): p. 1417-27.
64. Takahashi, H., et al., *Regression of nephropathy developed in diabetes by (Pro)renin receptor blockade*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(7): p. 2054-61.
65. Ramser, J., et al., *A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(8): p. 1019-27.
66. Corvol, P., et al., *Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme*. *J Hypertens Suppl*, 1995. **13**(3): p. S3-10.
67. Costerousse, O., et al., *Angiotensin I-converting enzyme (kininase II) in cardiovascular and renal regulations and diseases*. *Biol Res*, 1998. **31**(3): p. 161-7.
68. Sturrock, E.D., et al., *Structure of angiotensin I-converting enzyme*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(21): p. 2677-86.
69. Landmesser, U. and H. Drexler, *Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonism on endothelial function: role of bradykinin and nitric oxide*. *J Hypertens Suppl*, 2006. **24**(1): p. S39-43.
70. Yang, F., et al., *Ac-SDKP reverses inflammation and fibrosis in rats with heart failure after myocardial infarction*. *Hypertension*, 2004. **43**(2): p. 229-36.
71. Azizi, M., et al., *Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(3): p. 839-44.
72. Rieger, K.J., et al., *Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline*. *Biochem J*, 1993. **296** (Pt 2): p. 373-8.
73. Azizi, M., et al., *High plasma level of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline: a new marker of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition*. *Hypertension*, 1997. **30**(5): p. 1015-9.
74. Rasoul, S., et al., *Antifibrotic effect of Ac-SDKP and angiotensin-converting enzyme inhibition in hypertension*. *J Hypertens*, 2004. **22**(3): p. 593-603.
75. Wang, D., et al., *N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline stimulates angiogenesis in vitro and in vivo*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(5): p. H2099-105.
76. van der Meer, P., et al., *Levels of hematopoiesis inhibitor N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline partially explain the occurrence of anemia in heart failure*. *Circulation*, 2005. **112**(12): p. 1743-7.

77. Donoghue, M., et al., *A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9*. *Circ Res*, 2000. **87**(5): p. E1-9.
78. Tipnis, S.R., et al., *A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(43): p. 33238-43.
79. Vickers, C., et al., *Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(17): p. 14838-43.
80. Lely, A.T., et al., *Renal ACE2 expression in human kidney disease*. *J Pathol*, 2004. **204**(5): p. 587-93.
81. Hamming, I., et al., *Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis*. *J Pathol*, 2004. **203**(2): p. 631-7.
82. Harmer, D., et al., *Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme*. *FEBS Lett*, 2002. **532**(1-2): p. 107-10.
83. Danilczyk, U., et al., *Physiological roles of angiotensin-converting enzyme 2*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(21): p. 2714-9.
84. Crackower, M.A., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function*. *Nature*, 2002. **417**(6891): p. 822-8.
85. Hilbert, P., et al., *Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats*. *Nature*, 1991. **353**(6344): p. 521-9.
86. Li, W., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus*. *Nature*, 2003. **426**(6965): p. 450-4.
87. Kuba, K., et al., *A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury*. *Nat Med*, 2005. **11**(8): p. 875-9.
88. Imai, Y., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure*. *Nature*, 2005. **436**(7047): p. 112-6.
89. Wolny, A., et al., *Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart*. *Circ Res*, 1997. **80**(2): p. 219-27.
90. Doggrell, S.A. and J.C. Wanstall, *Cardiac chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of chymase inhibitors*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005. **83**(2): p. 123-30.
91. Urata, H., H. Nishimura, and D. Ganten, *Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans*. *Am J Hypertens*, 1996. **9**(3): p. 277-84.
92. Urata, H., F. Strobel, and D. Ganten, *Widespread tissue distribution of human chymase*. *J Hypertens Suppl*, 1994. **12**(9): p. S17-22.
93. Takai, S., et al., *Therapeutic applications of chymase inhibitors in cardiovascular diseases and fibrosis*. *Eur J Pharmacol*, 2004. **501**(1-3): p. 1-8.
94. Kugler, P., *Localization of aminopeptidase A (angiotensinase A) in the rat and mouse kidney*. *Histochemistry*, 1981. **72**(2): p. 269-78.
95. Reaux-Le Goazigo, A., et al., *Role of angiotensin III in hypertension*. *Curr Hypertens Rep*, 2005. **7**(2): p. 128-34.
96. Wang, J.M., et al., *Conversion of angiotensin II into active fragments by an endosomal pathway in bovine adrenal medullary cells in primary culture*. *Endocrinology*, 1995. **136**(12): p. 5274-82.
97. Lee, C.M. and S.H. Snyder, *Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(20): p. 12043-50.

98. Friedman, T.C., M. Orłowski, and S. Wilk, *Prolyl endopeptidase: inhibition in vivo by N-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal*. J Neurochem, 1984. **42**(1): p. 237-41.
99. Chappell, M.C., et al., *Antihypertensive effects of angiotensin-(1-7)*. Braz J Med Biol Res, 1998. **31**(9): p. 1205-12.
100. Irani, A.M., et al., *Human mast cell carboxypeptidase. Selective localization to MCTC cells*. J Immunol, 1991. **147**(1): p. 247-53.
101. Deschepper, C.F., *Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II*. Kidney Int, 1994. **46**(6): p. 1561-3.
102. Hall, J.E., *Historical perspective of the renin-angiotensin system*. Mol Biotechnol, 2003. **24**(1): p. 27-39.
103. Menard, J., et al., *Biochemistry and regulation of angiotensinogen*. Clin Exp Hypertens A, 1983. **5**(7-8): p. 1005-19.
104. Ng, K.K. and J.R. Vane, *Conversion of angiotensin I to angiotensin II*. Nature, 1967. **216**(5117): p. 762-6.
105. Quinn, S.J. and G.H. Williams, *Regulation of aldosterone secretion*. Annu Rev Physiol, 1988. **50**: p. 409-26.
106. Lanckmans, K., et al., *Nano-LC-MS/MS for the monitoring of angiotensin IV in rat brain microdialysates: limitations and possibilities*. J Sep Sci, 2007. **30**(14): p. 2217-24.
107. Welches, W.R., K.B. Brosnihan, and C.M. Ferrario, *A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11*. Life Sci, 1993. **52**(18): p. 1461-80.
108. Ferrario, C.M. and M.C. Chappell, *Novel angiotensin peptides*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(21): p. 2720-7.
109. Iyer, S.N., C.M. Ferrario, and M.C. Chappell, *Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system*. Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 356-61.
110. Dzau, V.J. and R. Re, *Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift?* Circulation, 1994. **89**(1): p. 493-8.
111. Ganten, D., et al., *Angiotensin-forming enzyme in brain tissue*. Science, 1971. **173**(991): p. 64-5.
112. Rossi, G.P., et al., *Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(2): p. 300-7.
113. Leung, P.S., *The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs*. Curr Protein Pept Sci, 2004. **5**(4): p. 267-73.
114. Tahmasebi, M., et al., *The tissue renin-angiotensin system in human pancreas*. J Endocrinol, 1999. **161**(2): p. 317-22.
115. Leung, P.S., et al., *Expression and localization of the renin-angiotensin system in the rat pancreas*. J Endocrinol, 1999. **160**(1): p. 13-9.
116. Chappell, M.C., et al., *Evidence for an intrinsic angiotensin system in the canine pancreas*. J Hypertens, 1991. **9**(8): p. 751-9.
117. Campbell, D.J. and J.F. Habener, *Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat*. J Clin Invest, 1986. **78**(1): p. 31-9.
118. Lam, K.Y. and P.S. Leung, *Regulation and expression of a renin-angiotensin system in human pancreas and pancreatic endocrine tumours*. Eur J Endocrinol, 2002. **146**(4): p. 567-72.

119. Leung, P.S., H.C. Chan, and P.Y. Wong, *Immunohistochemical localization of angiotensin II in the mouse pancreas*. Histochem J, 1998. **30**(1): p. 21-5.
120. Chappell, M.C., D.I. Diz, and D.W. Jacobsen, *Pharmacological characterization of angiotensin II binding sites in the canine pancreas*. Peptides, 1992. **13**(2): p. 313-8.
121. Chappell, M.C., D.W. Jacobsen, and E.A. Tallant, *Characterization of angiotensin II receptor subtypes in pancreatic acinar AR42J cells*. Peptides, 1995. **16**(4): p. 741-7.
122. Leung, P.S., et al., *Localization of angiotensin II receptor subtypes AT1 and AT2 in the pancreas of rodents*. J Endocrinol, 1997. **153**(2): p. 269-74.
123. Ghiani, B.U. and M.A. Masini, *Angiotensin II binding sites in the rat pancreas and their modulation after sodium loading and depletion*. Comp Biochem Physiol A Physiol, 1995. **111**(3): p. 439-44.
124. Chan, W.P., et al., *Activation of local renin-angiotensin system by chronic hypoxia in rat pancreas*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **160**(1-2): p. 107-14.
125. Ip, S.P., et al., *The recovery of some components of the renin angiotensin system in the rat pancreas after chronic exposure to hypoxic condition*. J Mol Endocrinol, 2003. **31**(3): p. 563-71.
126. Kuwahira, I., et al., *Changes in regional blood flow distribution and oxygen supply during hypoxia in conscious rats*. J Appl Physiol, 1993. **74**(1): p. 211-4.
127. Carlsson, P.O., C. Berne, and L. Jansson, *Angiotensin II and the endocrine pancreas: effects on islet blood flow and insulin secretion in rats*. Diabetologia, 1998. **41**(2): p. 127-33.
128. Leung, P.S., W.P. Chan, and R. Nobile, *Regulated expression of pancreatic renin-angiotensin system in experimental pancreatitis*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **166**(2): p. 121-8.
129. Reddy, M.K., K. Baskaran, and A. Molteni, *Inhibitors of angiotensin-converting enzyme modulate mitosis and gene expression in pancreatic cancer cells*. Proc Soc Exp Biol Med, 1995. **210**(3): p. 221-6.
130. Lau, T., P.O. Carlsson, and P.S. Leung, *Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets*. Diabetologia, 2004. **47**(2): p. 240-8.
131. Chu, K.Y., et al., *Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell funktion and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes*. Diabetes, 2006. **55**(2): p. 367-74.
132. Tikellis, C., et al., *Improved islet morphology after blockade of the renin-angiotensin system in the ZDF rat*. Diabetes, 2004. **53**(4): p. 989-97.
133. Lupi, R., et al., *The direct effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitors, zofenoprilat and enalaprilat, on isolated human pancreatic islets*. Eur J Endocrinol, 2006. **154**(2): p. 355-61.
134. Ko, S.H., et al., *High glucose increases extracellular matrix production in pancreatic stellate cells by activating the renin-angiotensin system*. J Cell Biochem, 2006. **98**(2): p. 343-55.
135. Chan, H.C., et al., *Angiotensin II receptor type I-regulated anion secretion in cystic fibrosis pancreatic duct cells*. J Membr Biol, 1997. **156**(3): p. 241-9.
136. Cheng, H.S., et al., *Angiotensin II-mediated signal transduction events in cystic fibrosis pancreatic duct cells*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1449**(3): p. 254-60.
137. Fink, A.S., et al., *Angiotensin II evokes calcium-mediated signaling events in isolated dog pancreatic epithelial cells*. Pancreas, 2002. **25**(3): p. 290-5.

138. Howard-McNatt, M. and A.S. Fink, *Captopril inhibits secretin-induced pancreatic bicarbonate output*. J Surg Res, 2002. **103**(1): p. 96-9.
139. Cheung, W.T., et al., *Characterization of a functional AT1A angiotensin receptor in pancreatoma AR4-2J cells*. Peptides, 1999. **20**(7): p. 829-36.
140. Tsang, S.W., C.H. Cheng, and P.S. Leung, *The role of the pancreatic renin-angiotensin system in acinar digestive enzyme secretion and in acute pancreatitis*. Regul Pept, 2004. **119**(3): p. 213-9.
141. Tsang, S.W., et al., *Differential effects of saralasin and ramiprilat, the inhibitors of renin-angiotensin system, on cerulein-induced acute pancreatitis*. Regul Pept, 2003. **111**(1-3): p. 47-53.
142. Ip, S.P., et al., *Saralasin, a nonspecific angiotensin II receptor antagonist, attenuates oxidative stress and tissue injury in cerulein-induced acute pancreatitis*. Pancreas, 2003. **26**(3): p. 224-9.
143. Tsang, S.W., S.P. Ip, and P.S. Leung, *Prophylactic and therapeutic treatments with AT 1 and AT 2 receptor antagonists and their effects on changes in the severity of pancreatitis*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(2): p. 330-9.
144. Chan, Y.C. and P.S. Leung, *AT1 receptor antagonism ameliorates acute pancreatitis-associated pulmonary injury*. Regul Pept, 2006. **134**(1): p. 46-53.
145. Chan, Y.C. and P.S. Leung, *Angiotensin II type 1 receptor-dependent nuclear factor-kappaB activation-mediated proinflammatory actions in a rat model of obstructive acute pancreatitis*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **323**(1): p. 10-8.
146. Kuno, A., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates pancreatic inflammation and fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats*. Gastroenterology, 2003. **124**(4): p. 1010-9.
147. Wang, X.P., et al., *Angiotensin II mediates acinar cell apoptosis during the development of rat pancreatic fibrosis by AT1R*. Pancreas, 2004. **29**(4): p. 264-70.
148. Sokol, S.I., et al., *Modulation of the renin-angiotensin-aldosterone system for the secondary prevention of stroke*. Neurology, 2004. **63**(2): p. 208-13.
149. Wolf, G. and E. Ritz, *Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: pathophysiology and indications*. Kidney Int, 2005. **67**(3): p. 799-812.
150. Lim, H. and Y.Z. Zhu, *Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(22): p. 2584-96.
151. Kobori, H., et al., *The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease*. Pharmacol Rev, 2007. **59**(3): p. 251-87.
152. Scheen, A.J., *Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus. Part 1. A meta-analysis of randomised clinical trials*. Diabetes Metab, 2004. **30**(6): p. 487-96.
153. Abuissa, H., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(5): p. 821-6.
154. Giacchetti, G., et al., *The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(3): p. 120-6.
155. Henriksen, E.J., *Improvement of Insulin Sensitivity by Antagonism of the Renin-Angiotensin System*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007.
156. Ko, S.H., et al., *Ramipril treatment suppresses islet fibrosis in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(1): p. 114-22.

157. Zhang, C.Y., et al., *Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes*. Cell, 2001. **105**(6): p. 745-55.
158. Chu, K.Y. and P.S. Leung, *Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonism Mediates Uncoupling Protein 2-Driven Oxidative Stress and Ameliorates Pancreatic Islet beta-Cell Function in Young Type 2 Diabetic Mice*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(7): p. 869-78.
159. Nakayama, M., et al., *Increased expression of NAD(P)H oxidase in islets of animal models of Type 2 diabetes and its improvement by an AT1 receptor antagonist*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(4): p. 927-33.
160. Shao, J., et al., *Beneficial effects of candesartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, on beta-cell function and morphology in db/db mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(4): p. 1224-33.
161. Huang, Z., L. Jansson, and A. Sjöholm, *Vasoactive drugs enhance pancreatic islet blood flow, augment insulin secretion and improve glucose tolerance in female rats*. Clin Sci (Lond), 2007. **112**(1): p. 69-76.
162. Huang, Z., L. Jansson, and A. Sjöholm, *Pancreatic islet blood flow is selectively enhanced by captopril, irbesartan and pravastatin, and suppressed by palmitate*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **346**(1): p. 26-32.
163. Dunning, B.E., J.H. Moltz, and C.P. Fawcett, *Actions of neurohypophysial peptides on pancreatic hormone release*. Am J Physiol, 1984. **246**(1 Pt 1): p. E108-14.
164. Ramracheya, R.D., et al., *Direct regulation of insulin secretion by angiotensin II in human islets of Langerhans*. Diabetologia, 2006. **49**(2): p. 321-31.
165. Miyazaki, J., et al., *Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms*. Endocrinology, 1990. **127**(1): p. 126-32.
166. Asfari, M., et al., *Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines*. Endocrinology, 1992. **130**(1): p. 167-78.
167. Rüsing, D., *Diadenosinpolyphosphate und P1-Rezeptorliganden: Einfluss auf den Lipid-, Glukose- und Insulinstoffwechsel in vitro und in vivo (Ratte)*. Dissertation, 2005.
168. Green, H. and M. Meuth, *An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture*. Cell, 1974. **3**(2): p. 127-33.
169. Weiland, F., *Angiotensin-Rezeptoren und Peptide als Bestandteil eines parakrinen Angiotensin-Systems im Fettgewebe*. Dissertation, 2005: p. 54-57.
170. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
171. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
172. Verspohl, E., *[Nanogram analysis with radioimmunoassay]*. Pharm Unserer Zeit, 1975. **4**(6): p. 161-70.
173. Juan, C.C., et al., *Angiotensin II enhances insulin sensitivity in vitro and in vivo*. Endocrinology, 2005. **146**(5): p. 2246-54.
174. Wong, P.F., S.S. Lee, and W.T. Cheung, *Immunohistochemical colocalization of type II angiotensin receptors with somatostatin in rat pancreas*. Regul Pept, 2004. **117**(3): p. 195-205.

175. Philippe, J., *Somatostatin inhibits insulin-gene expression through a posttranscriptional mechanism in a hamster islet cell line*. *Diabetes*, 1993. **42**(2): p. 244-9.
176. Redmon, J.B., H.C. Towle, and R.P. Robertson, *Regulation of human insulin gene transcription by glucose, epinephrine, and somatostatin*. *Diabetes*, 1994. **43**(4): p. 546-51.
177. Strowski, M.Z., et al., *Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice*. *Endocrinology*, 2000. **141**(1): p. 111-7.
178. Strowski, M.Z., et al., *Somatostatin receptor subtype 5 regulates insulin secretion and glucose homeostasis*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(1): p. 93-106.
179. Mitra, S.W., et al., *Colocalization of somatostatin receptor sst5 and insulin in rat pancreatic beta-cells*. *Endocrinology*, 1999. **140**(8): p. 3790-6.
180. Wennemuth, G. and G. Aumuller, *Angiotensin II-mediated calcium signals and mitogenesis in human prostate stromal cell line hPCPs*. *Br J Pharmacol*, 2005. **144**(1): p. 3-10.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Doktor Eugen J. Verspohl danken unter dessen Anleitung diese Arbeit im Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie angefertigt wurde.

Danken möchte ich ihm vor allem dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat diese Doktorarbeit anzufertigen, für sein Vertrauen in meine Selbstständigkeit und die Unterstützung bei dem von mir in dieser Arbeit bearbeiteten Thema.

Daneben danke ich Doris Rüsing, Felix Weiland, Anja Riyazi, Marcel Töpfer und Nina Wienkötter als ehemaligen und Dr. Frank Begrow, Katrin Bauer, Mira König, Maik Siebelmann, Katharina Heimes, Jonas Engelbertz und Corinna Böckenholt als aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises für ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und dafür, dass wir über die Zeit zu mehr als nur Arbeitskollegen geworden sind.

Meiner Frau danke ich für ihre Aufmunterungen und ihre Stärke durch die sie mich während meiner Promotion immer wieder neu motivieren konnte. Ich danke ihr für ihre Geduld und ihr Verständnis, das sie auch in schwierigen Zeiten immer für mich hatte.

Aber vor allem danke ich ihr für ihre Liebe.

Ich danke meinen Eltern, dafür dass sie mir durch weit mehr als nur finanzielle Unterstützung mein Studium ermöglicht und damit die Voraussetzungen für meine Promotion geschaffen haben.

Meinen Praktikanten aus dem Wahlpflichtfach Maike Herwig, Elisabeth Volmer und Qian Mao danke ich für die tatkräftige Mithilfe und dafür, dass sie mir einen anderen Blickwinkel auf meine Arbeit ermöglicht haben.