

Pharmakologie und Toxikologie

**DER ANGIOTENSIN 4-REZEPTOR / IRAP ALS BESTANDTEIL
EINES LOKALEN ANGIOTENSIN-SYSTEMS DER BETA-ZELLE**

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

vorgelegt von
Maik Siebelmann
aus Münster

-2008-

Dekan:	Prof. Dr. F. Ekkehardt Hahn
Erster Gutacher:	Prof. Dr. E.J. Verspohl
Zweiter Gutacher:	Prof. Dr. Matthias Lehr
Tag der mündlichen Prüfungen:	11.07.2008
Tag der Promotion:	11.07.2008

„Ich habe keine besondere Begabung, sondern bin nur
leidenschaftlich neugierig“

Albert Einstein

MEINER FRAU, MEINER FAMILIE, MEINEN FREUNDEN

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM	1
1.1.1	REZEPTOREN DES RAS	2
1.1.2	ANGIOTENSIN PEPTIDE	4
1.1.3	BILDUNG DER ANGIOTENSIN PEPTIDE	5
1.2	DAS PANKREAS	7
1.3	DAS RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM DES PANKREAS	8
1.3.1	DAS RAS DES EXOKRINEN PANKREAS	10
1.3.2	DAS RAS DES ENDOKRINEN PANKREAS	11
1.3.2.1	Mögliche Rolle des RAS im Endokrinen Pankreas	14
1.3.3	INTRAZELLULÄRES RAS	17
1.4	ZINK-ABHÄNGIGE AMINOPEPTIDASEN	20
1.4.1	DIE M1 FAMILIE DER ZINK-ABHÄNGIGEN AMINOPEPTIDASEN	20
1.4.1.1	Aminopeptidase A (APA)	21
1.4.1.2	Aminopeptidase N (APN)	22
1.4.1.3	Thyreotropin-releasing hormone-degrading Ectoenzyme (TRH-DE)	23
1.4.1.4	Leukotrien-A4-Hydrolase (LTA4H)	23
1.4.1.5	Aminopeptidase B (APB)	23
1.4.1.6	Adipocyte-Derived Leucine Aminopeptidase (A-LAP)	24
1.4.1.7	Leukocyte-Derived Arginine Aminopeptidase (L-RAP)	24
1.4.1.8	Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA)	24
1.4.1.9	Aminopeptidase Q (APQ, Laeverin)	25
1.4.1.10	Aminopeptidase O (APO)	25
1.4.1.11	Insulin regulierte Aminopeptidase (IRAP)	25
1.5	INSULIN REGULIERTE AMINOPEPTIDASE (IRAP)	26
1.5.1	IRAP ALS AT ₄ -REZEPTOR	28
1.5.2	VORKOMMEN VON IRAP	29
1.5.2.1	Rolle von IRAP im peripheren und zentralen Glukosestoffwechsel	29
1.5.2.2	Rolle von IRAP im Verlauf einer Schwangerschaft	30
1.5.3	IRAP-SUBSTRATE	31
1.5.4	IRAP-INHIBITOREN / AT ₄ -REZEPTORLIGANDEN	32
1.5.4.1	Struktur-Wirkungsbeziehung	32
1.5.4.2	ANG IV	32
1.5.4.3	Nle-ANG IV	33
1.5.4.4	Divalinal	33
1.5.4.5	LVV-Hemorphin-7	34
1.5.5	ANG IV-EFFEKTE	34
1.5.5.1	Der AT ₄ -Rezeptor und ANG IV im ZNS	35
1.5.5.2	ANG IV und PAI-1-Expression	36
1.6	ZIELSETZUNG	40

2	<u>MATERIAL</u>	41
2.1	ZELLINIEN	41
2.1.1	INS-1 ZELLEN	41
2.1.2	3T3-L1 ZELLEN	41
2.2	ZELLKULTUR	42
2.3	SONSTIGE CHEMIKALIEN	45
2.4	GENTECHNISCHE ARBEITEN	46
2.4.1	PLASMIDE	47
2.5	WESTERN BLOT	49
2.6	KONFOKALE LASERSCANNING MIKROSKOPIE	51
2.7	RADIOAKTIVE ASSAYS	52
2.8	IRAP-ASSAY	53
2.9	HPLC-MS	54
3	<u>TIERE</u>	55
4	<u>METHODEN</u>	56
4.1	ZELLKULTUR	56
4.2	GENTECHNISCHE ARBEITEN	56
4.2.1	ARBEIT MIT GENTECHNISCH VERÄNDERTEN ORGANISMEN	56
4.2.2	TRANSFORMATION	56
4.2.3	DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	58
4.2.4	TRANSFEKTION	58
4.2.4.1	Transiente Transfektion	59
4.2.4.2	Stabile Transfektion	59
4.2.5	REAL TIME PCR	60
4.3	WESTERN BLOT	63
4.3.1	ZELLAUFARBEITUNG	63
4.3.2	GELELEKTROPHORESE UND SDS-PAGE	63
4.4	KONFOKALE LASERSCANNING MIKROSKOPIE	66
4.4.1	PRINZIP DER KONFOKALEN MIKROSKOPIE	67
4.5	RADIOAKTIVE METHODEN	69
4.5.1	DIE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -AUFNAHME	69
4.5.2	INSULINSEKRETION UND RIA	70
4.6	IRAP-ASSAY	70
4.7	IN VIVO VERSUCHE	71

4.7.1	GLUKOSETOLERANZTEST (GTT)	71
4.7.2	BLUTGLUKOSE-BESTIMMUNG	71
4.7.3	PLASMAINSULIN-BESTIMMUNG	72
4.8	HPLC-MS	73
4.8.1	QUALITATIVE HPLC-MS	73
4.8.2	QUANTITATIVE HPLC-MS	75
4.9	STATISTIK	76
4.10	METHODENBEWERTUNG / -KRITIK	77
4.10.1	PAI-1-GENEXPRESSION	77
4.10.2	WESTERN BLOT	78
4.10.3	KONFOKALE LASERSCANNING MIKROSKOPIE	79
4.10.4	RADIOAKTIVE METHODEN	80
4.10.4.1	⁴⁵ Ca ²⁺ -Aufnahme	80
4.10.4.2	Insulinsekretion	80
4.10.5	IRAP-ASSAY	81
4.10.6	<i>IN VIVO</i> -UNTERSUCHUNGEN	81
4.10.7	HPLC-MS	82
5	ERGEBNISSE	84
5.1	WESTERN BLOT	84
5.2	KONFOKALE LASERSCANNING MIKROSKOPIE	86
5.2.1	LOKALISATION VON IRAP IN DER INS-1 ZELLE	86
5.2.2	BEEINFLUSSUNG DER VESIKULÄREN SPEICHERUNG	88
5.3	RADIOAKTIVE METHODEN	89
5.3.1	⁴⁵ CA ²⁺ -AUFNAHME	89
5.3.1.1	ANG IV-induzierte Ca ²⁺ -Aufnahme	90
5.3.2	INSULINSEKRETION UND RADIOIMMUNOASSAY	92
5.4	ANG IV-INDUZIERTER PAI-1-EXPRESSION	96
5.5	BEINFLUSSUNG DER IRAP-AKTIVITÄT	98
5.5.1	VORVERSUCHE	98
5.5.2	IC ₅₀ -BESTIMMUNG DER ANGIOTENSIN PEPTIDE	99
5.5.3	ANG III ALS AT ₄ -AGONIST	101
5.5.4	ENZYMHEMMUNG DURCH IRAP-SUBSTRATE	102
5.6	<i>IN VIVO</i>-VERSUCHE MIT ANG IV (BLUTGLUKOSE UND PLASMAINSULIN)	104
5.6.1	BLUTGLUKOSEBESTIMMUNG	104
5.6.2	WIRKUNG VON ANG IV AUF DEN BLUTGLUKOSESPIEGEL DER RATTE	106
5.6.3	PLASMAINSULINBESTIMMUNG	107
5.6.4	EFFEKT VON ANG IV AUF DIE PLASMAINSULINKONZENTRATION	108

5.7 HPLC-MS	110
5.7.1 QUALITATIVE HPLC-MS	110
5.7.1.1 Abbau von Angiotensinogen	111
5.7.1.2 Abbau von ANG I	113
5.7.1.3 Abbau von ANG II	115
5.7.1.4 Abbau von ANG III	116
5.7.1.5 Abbau von ANG IV	116
5.7.1.6 Abbau von ANG 4-8	117
5.7.2 QUANTITATIVE HPLC-MS	118
5.7.2.1 Quantifizierung des ANG II- und ANG III-Abbaus	118
5.7.2.2 Quantifizierung des ANG IV-Abbaus	119
6 DISKUSSION	120
6.1 DER AT₄-REZEPTOR / IRAP IN DER B-ZELLE	120
6.1.1 LOKALISATION UND VESIKULÄRE SPEICHERUNG	120
6.1.1.1 Lokalisation des AT ₄ -Rezeptors / IRAP	121
6.1.1.2 Vesikuläre Speicherung des AT ₄ -Rezeptors / IRAP	124
6.1.2 DER AT ₄ -REZEPTOR	126
6.1.3 <i>IN VIVO</i> -EFFEKTE VON ANG IV	134
6.2 ANGIOTENSIN-TURNOVER IM ENDOKRINEN PANKREAS	137
7 ZUSAMMENFASSUNG	140
7.1 ERGEBNISSE	140
7.2 SCHLUSSFOLGERUNG UND ARBEITSHYPOTHESEN	141
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	143
9 LITERATURVERZEICHNIS	145

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acyl-Coenzym A Dehydrogenase
ACE	Angiotensin converting enzyme
AGT	Angiotensinogen
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANG	Angiotensin
AP	Aminopeptidase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AP-1	Aktivator Protein-1
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
cDNA	Copy DNA
CE	Kapillarelektrophorese
cFOS	Kernrezeptor
cJUN	Kernrezeptor
CTGF	Connective tissue growth factor
DAP	Diaminopeptidase
DMEM	Dulbecco´s Minimum Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
DTT	Dithiothreitol
EC 27	APN-Inhibitor: (S)-2-amino-pentan-1,5-dithiol
EC 33	APA-Inhibitor: (S)-3-amino-4-mercaptobutyl sulfonic acid
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
ERK	Extracellular signal regulated kinase
ESI	Elektospray ionisation
FCS	Fetal calf serum
GFP	Green fluorescence proteine
GIP	Glucose-dependent insulinotropic peptide
GLP-1	Glucagon-like peptid 1
GLUT	Glukosetransporter
GSV	GLUT4-Speichervesikel
GTP	Guanintriphosphat
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horse radish peroxidase
IBMX	1-Methyl-3-isobutylxanthine
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IGF	Insulin like growth faktor
IRAP	Insulin-regulierte Aminopeptidase
IRS	Insulinrezeptor-Substrat

JNK	c-Jun-N-terminal kinase
CLSM	Konfokale Laserscanning Mikroskopie
LB-Medium	Lysogeny broth-medium
Leu-NA	Leucyl- β -Naphthylamid
LTA4	Leukotrien A4
LTB4	Leukotrien B4
LTP	Long term potentiation
M6P	Mannose-6-Phosphat
MAP	Mitogen-Aktiviertes Protein
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MHC-1	Major Histon Kompatibilitäts Komplex Klasse-1
MIN	Mouse Insulinoma
MS	Massenspektrometer
mRNA	Messenger RNA
NA	β -Amino-Naphthalin
NAD(P)H	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NEP	Neprilysin, Neutrale Endopeptidase
NF κ B	Nuclear factor-kappa B
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
OLETF	Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats
PAI-1	Plasminogen-activator-inhibitor-1
PC 18	unspezifischer AP-Inhibitor: 2-amino-4-methylsulfonylbutanethiol
PDGF	Platelet derived growth factor
PDK-1	3'-Phosphoinositide-dependent kinase-1
PGE ₂	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC λ	Proteinkinase C
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PLZF	Promyelocytic leukaemia zinc finger proteine
PMSF	Phenylmethylsulphonyl Fluoride
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAS	Renin-Angiotensin-System
RER	Reninrezeptor
RIA	Radioimmunoassay
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SARILE	(Sar1;Ile8)-Angiotensin II
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming growth factor beta
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TRH	Thyreotropin releasing hormon

1 Einleitung

1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das systemische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine wichtige Rolle bei der Blutdruck-, Elektrolyt- und Flüssigkeitsregulation des Körpers^[1]. Renin wird als (Pro)Renin in den juxtaglomerulären Zellen der Niere synthetisiert und gespeichert. Diese Zellen befinden sich in den Wänden der afferenten Arteriolen der Niere und reagieren auf intrarenale und zentrale Stimulation mit der Sekretion von Renin. Ein Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks unter 60 mmHg aktiviert Barorezeptoren im Aortenbogen und führt zu einer Sympathikusaktivierung und Adrenalinfreisetzung. Adrenalin aktiviert über β_1 -Rezeptoren der juxtaglomerulären Zellen die Reninausschüttung.

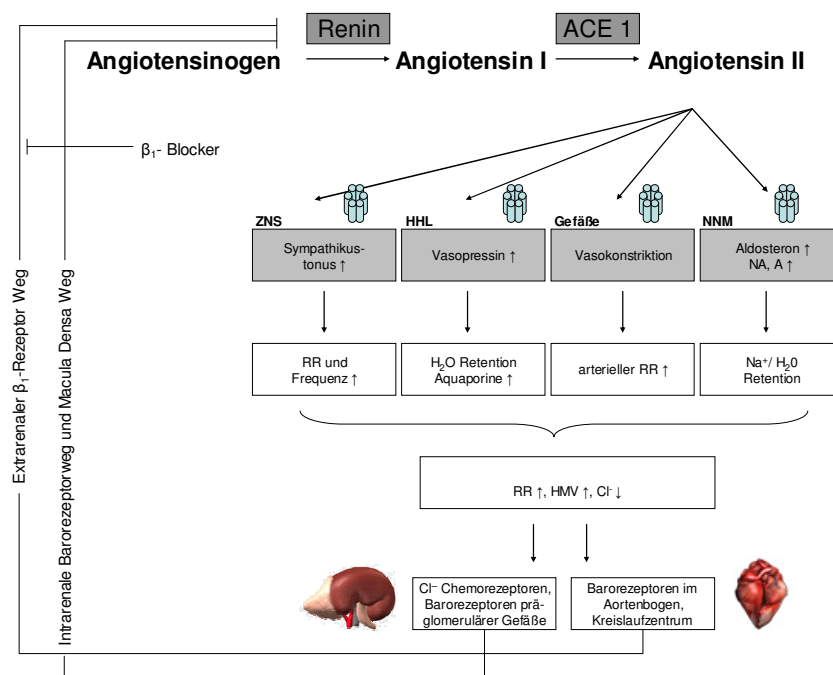


Abbildung 1-1: Aufbau des systemischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sowie dessen Regulationsmechanismen

Der intrarenale Macula-densa-Weg (Cl⁻-Chemorezeptoren) sowie intrarenale Barorezeptoren in den präglomerulären Gefäßen der Niere modifizieren ebenfalls die Reninfreisetzung. Renin spaltet als Aspartyl-Protease das α_2 -Globulin Angiotensinogen (AGT), welches primär in der Leber synthetisiert wird, zu Angiotensin I (ANG I). Die Sekretion wird von Glukocortikoiden, Schilddrüsenhormonen und Angiotensin II (ANG II) stimuliert. ANG I wird schnell

durch das Angiotensin Converting Enzym (ACE) zu ANG II abgebaut. Seine Effekte vermittelt ANG II über G-Protein-gekoppelteⁱ AT₁- und AT₂-Rezeptoren. ANG II spielt also eine wesentliche Rolle in der kurz- und mittelfristigen Blutdruckregulation des Körpers. Die Inhibition des systemischen RAAS mit ACE-Hemmern, AT₁-Rezeptorantagonisten und neuerdings durch Renin-Inhibitoren ist somit ein wichtiges Instrument zur Behandlung der Hypertonie und Herzinsuffizienz. ANG II hat neben seinem hämodynamischen Effekt eine stimulierende Wirkung auf tubuläre Transportvorgänge, wirkt als auto- und parakriner Wachstumsfaktor, induziert profibrogene Zytokine und hat proinflammatorische Effekte^[2]. So konnte z.B. die Progression einer diabetischen Nephropathie durch die Blockade des RAAS verlangsamt werden^[3].

1.1.1 Rezeptoren des RAAS

- AT₁- und AT₂-Rezeptor

Sowohl der AT₁-Rezeptor als auch der AT₂-Rezeptor sind als membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben. Die Beschreibung der Postrezeptorkaskade des AT₁-Rezeptors ist uneinheitlich und es existieren neben G_{q/11}-, G_{12/13}- und G_{i/o}-gekoppelten AT₁-Rezeptoren auch Rezeptoren, die mit einer Tyrosinkinaseaktivität ausgestattet sind. Die Vielzahl an möglichen Postrezeptorkaskaden erklärt die pleiotropen Wirkungen, die durch eine Aktivierung des AT₁-Rezeptors in unterschiedlichen Geweben ausgelöst werden.

Der AT₂-Rezeptor ist G_i-Protein-gekoppelt und wird ebenfalls durch Bindung von ANG II aktiviert. Die Aktivierung führt zur Stimulation verschiedener Phosphatasen mit der Folge, dass AT₁-Rezeptor-abhängige Effekte antagonisiert werden.

Der AT₁- als auch der AT₂-Rezeptor wurden von Weiland et al. und Wensing et al. ausführlich beschrieben^[4, 5].

- AT₄-Rezeptor / IRAP

Der AT₄-Rezeptor / IRAP wird in Kapitel 1.5 ausführlich beschrieben.

- Mas-Rezeptor / Angiotensin 1-7 Rezeptor

Der Mas-Rezeptor, der hauptsächlich im Gehirn und in den Hoden lokalisiert ist, wird durch Bindung von ANG 1-7 aktiviert. Er ist ebenfalls als G-Protein-gekoppelter

ⁱ G-Protein = GTP-bindendes Protein

Rezeptor beschrieben und vermittelt seine Effekte über den Arachidonsäurestoffwechsel mit Inositoltrisphosphat als second messenger. Die pleiotropen Effekte, die durch Aktivierung des Mas-Rezeptors ausgelöst werden, stehen den AT₁-Rezeptor-induzierten Wirkungen funktionell antagonistisch gegenüber. Der Mas-Rezeptor wurde ebenfalls von Weiland et al. und Wensing et al. beschrieben^[4, 5].

- Renin- / (Pro)Reninrezeptor (RPR)

(Pro)Renin und Renin besitzen spezifische zelluläre Bindungsstellen, wie z.B. den Mannose-6-Phosphat (M6P)-Rezeptor, der als Clearance-Rezeptorⁱⁱ beschrieben wird und glykosyliertes (Pro)Renin internalisiert und abbaut^[6]. Saris et al. konnten jedoch auch die Internalisierung und Aktivierung von nicht glykosyliertem (Pro)Renin in Kardiomyozyten beobachten. Dies hat eine erhöhte intrazelluläre Angiotensin-Bildung zur Folge^[7].

Ein weiterer Renin-Clearance-Mechanismus ist das Renin-Binding-Protein (RnBP). RnBP ist gleichbedeutend mit N-Acetyl-D-Glukosamin 2-Epimerase und Bestandteil des high molecular weight renin^[8].

In Mesangiumzellen und in der glatten Gefäßmuskulatur konnte ein Reninrezeptor (RER) identifiziert werden, der zum einen nach der Renin- oder (Pro)Renin-Bindung die katalytische Aktivität des Enzyms an der Zelloberfläche um den Faktor fünf erhöht und so die Bildung von Angiotensin Peptiden beschleunigt. Zum anderen führt die Bindung von Renin an den Rezeptor zur Aktivierung eines second messengers, der folgende Signalkaskade induziert^[9, 10]: Nach Renin- oder (Pro)Renin-Bindung kommt es zur Phosphorylierung des Rezeptors und zur Aktivierung des MAP-(Mitogen-Aktivierten Protein) Kinase Pathways mit Induktion von ERK-1 und -2 (Extracellular signal-regulated kinases)^[11].

Scheffé et al. konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Promyelocytik Zinc Finger (PLZF) direkt mit dem RER interagiert. Eine Aktivierung des Rezeptors führt zur Translokation von PLZF in den Nukleus und induziert die Transkription von p85 α , einer Untereinheit der PI3K^[12].

Neben der verstärkten PAI-1-Expression sind auch hypertrophe Effekte beschrieben^[10, 13].

ⁱⁱ Clearance-Rezeptor = Der Agonist wird nach Rezeptorbindung aus dem Plasma internalisiert und eliminiert

1.1.2 Angiotensin Peptide

- Angiotensinogen (AGT)

AGT ist ein α_2 -Glykoproteinⁱⁱⁱ, bestehend aus 452 Aminosäuren (AS), das hauptsächlich in der Leber gebildet und von dort in den Blutkreislauf sezerniert wird. Im Blut kommt es dann zur Renin-abhängigen Spaltung in das Dekapeptid ANG I. Außerdem wird es, wie viele andere Komponenten des RAAS, in lokalen RAS, wie dem Fettgewebe, gebildet.

- Angiotensin II

ANG II, ein Octapeptid, wird aus dem inaktiven Decapeptid ANG I größtenteils am Gefäßendothel ACE-1-abhängig gebildet. Eine ACE-unabhängige Biogenese über Chymasen wurde vor allem am Herzen beschrieben. Das Peptid ist 40 fach stärker vasokonstriktorisch als Noradrenalin (NA) und wirkt vor allem auf Arteriolen.

- Angiotensin III

ANG III, das durch Aminopeptidase A (APA) aus ANG II entsteht, ist das Angiotensin Peptid, welches im Gehirn für die Blutdruckregulation verantwortlich ist. Die zentralen Wirkungen, die klassisch ANG II zugeordnet wurden, werden hauptsächlich durch das weiter prozessierte ANG III über den AT₁- und AT₂-Rezeptor vermittelt, wodurch Substanzen, wie RB150 als APA-Inhibitor bei der Bluthochdrucktherapie eine interessante Wirkstoffklasse darstellen. Zusätzlich bindet ANG III hochaffin an AT₄-Rezeptoren und ist ein Inhibitor der IRAP.

- Angiotensin IV

Das Hexapeptid ANG IV entsteht durch N-terminalen Abbau aus ANG III. An chromaffinen Zellen aus dem Nebennierenmark konnte gezeigt werden, dass ANG II nach Internalisierung endosomal zu 80 % zu ANG IV abgebaut wird^[14]. Über die Bildung von ANG IV in anderen Geweben ist bis jetzt nicht viel bekannt, aber theoretisch kann jedes Gewebe, das die Peptidasen APA und Aminopeptidase N (APN) exprimiert, auch ANG IV bilden. Der extrazelluläre ANG IV-Spiegel im Gehirn beträgt ca. 40 pM, im Blut wurden physiologische Konzentrationen von ca. 10 pM gemessen^[15, 16].

ⁱⁱⁱ α_2 -Glykoprotein = Plasmaprotein (Charakterisiert nach elektrophoretischer Trennung)

auch gewebsspezifische Enzyme, wie Chymase, Cathepsin, Tonin oder t-PA, in der Lage, aus AGT ANG I zu bilden. ANG I wird durch die Zink-abhängige Metalloprotease ACE-1 zum Haupteffektorpeptid des RAS (ANG II) gespalten. Daneben existieren alternative Abbauwege über APA zu ANG 1-9 oder über ACE-2 zu ANG 2-10. Sowohl aus ANG 2-10 als auch aus ANG II ist die Bildung von ANG III möglich, wobei der Abbau über die APA bedeutsamer ist.

Der schnelle Abbau von ANG III zu ANG IV durch die APN und einiger anderen Enzyme, spiegelt die enge körpereigene Kontrolle des ANG III-Plasmaspiegels wider, die für eine hohe intrinsische Aktivität des Peptids spricht. ANG IV kann weiterhin aus ANG II durch Abspaltung des Asp-Arg Dipeptids in einem weniger bedeutsamen Nebenweg durch DPA III, die zytosolisch in Rattenhirnen gefunden wurde, gebildet werden^[20]. Das Hexapeptid wird N-terminal zu den vermutlich inaktiven Peptiden ANG 4-8 und ANG 5-8 metabolisiert. Das ebenfalls bioaktive Peptid ANG 1-7 wird, neben der direkten Bildung aus ANG I durch NEP, PEP oder TOP, aus ANG 1-9 durch ACE-1 oder in geringem Umfang durch NEP gebildet. ANG II kann ebenfalls durch ACE-2 und Carboxypeptidase P (CPP) zu ANG 1-7 abgebaut werden. Weitere C-terminale Abbauprodukte (ANG 1-6 und ANG 1-5) sowie das am AT₄-Rezeptor aktive N-terminale Abbauprodukt ANG 3-7 entstehen durch Carboxy- bzw. Aminopeptidasen aus ANG 1-7. (Abbildung 1-2)

Die Bildung der Angiotensin Peptide über weniger klassische Abbauwege spielt vermutlich in lokalen gewebsspezifischen RAS eine übergeordnete Rolle.

Die Enzyme des RAS sind von Wensing et al. und Weiland et al. im Rahmen ihrer Dissertationsarbeiten ausführlich beschrieben und charakterisiert worden^[4, 5].

1.2 Das Pankreas

Das Pankreas ist ein 14-18 cm langes und 50-120 g schweres Organ, das in unregelmäßige Lappen gegliedert ist, welche sich wiederum in kleinere Läppchen differenzieren. Es liegt auf Höhe des 2. Lendenwirbels zwischen Milz und Leber. Anatomisch ist es in Caput, Corpus und Cauda gegliedert wobei der Kopf vom Duodenum eng umfasst wird. Das menschliche Pankreas besitzt einen Ausführungsgang, den Ductus pancreaticus. Er endet gemeinsam mit dem Ductus choledochus im Duodenum.

Funktionell wird das Pankreas in exokrine

und endokrine Bereiche gegliedert. Als exokrine Drüse synthetisieren Azinuszellen Vorstufen der Verdauungsenzyme, wie Trypsinogen. Diese werden durch nervale und hormonelle Reize mit dem Pankreassaft in den Ductus pancreaticus sezerniert und gelangen so in den Zwölffingerdarm, wo sie durch Enterokinasen in die aktive Form überführt werden. In Epithelzellen der Drüsengänge wird über eine $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Ionenpumpe Bicarbonat sezerniert, welches zur Neutralisation der Magensäure im Duodenum dient.

Zellen des endokrinen Pankreas sind über das gesamte Pankreas verteilt, finden sich aber gehäuft in Corpus und Cauda. Sie sind inselförmig um Blutkapillaren angelegt und werden nach ihrem Entdecker als Langerhans-Inseln bezeichnet. Im menschlichen Pankreas findet man ca. 0,7-1 Million solcher Inseln. Innerhalb der Inseln werden eine Reihe von Zelltypen unterschieden (Abbildung 1-3). Sie sind von einem engen Kapillarsystem umgeben. Diese Kapillaren weisen ein fenestriertes Epithel auf, so dass die Inseln direkt mit dem Blutstrom in Verbindung stehen und bei Bedarf Hormone direkt in das Blut sezernieren können. Der Blutfluss selbst stellt somit eine wichtige Stellgröße für die Inselzellregulation dar. Das zum Pankreas fließende Blut transportiert Signalstoffe, wie z.B. Glukose, um die Insulinsekretion zu modulieren. In entgegengesetzter Richtung befördert das Blut endokrin wirksame Inselzellhormone vom Pankreas an die Wirkorte in der systemischen Zirkulation.

Zelltyp	Hormon
Alphazelle	Glukagon, GIP
Betazelle	Insulin Amylin Serotonin ^[21]
Deltazelle	Somatostatin, Pankreostatin β -Endorphin
PP-Zelle	Pankreatisches Polypeptid
Epsilonzelle	Ghrelin

Abbildung 1-3: Zelltypen des endokrinen Pankreas und ihre sezernierten Hormone.

1.3 Das Renin-Angiotensin-System des Pankreas

Lokale RAS

Neben dem beschriebenen systemischen RAAS sind in den letzten fünfzehn Jahren eine Vielzahl lokaler RAS entdeckt worden. Zu den Geweben, die ein lokales RAS aufweisen, gehören unter anderem Gehirn, Fettgewebe, Hoden, Herz, Gefäße und Niere^[22]. Sie sind nicht auf systemisch gebildetes ANG II angewiesen. Vielmehr sind diese Gewebe in der Lage, selbst ANG II zu bilden. Diese Systeme üben auf intra-, auto- und parakrinem Weg pharmakologische Effekte auf Zellebene aus. Hier sind Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation, Apoptose, Inflammation und Hormonsekretion^[23] zu nennen. Die Vielzahl der Parameter die durch Angiotensin Peptide beeinflusst werden können, lässt die gewebsspezifischen RAS als therapeutisches Target attraktiv erscheinen. Die bereits entdeckten Komponenten des pankreatischen RAS sind in Abbildung 1-4 dargestellt.

Das pankreatische RAS

Viele Hinweise unterstützen die Annahme eines lokalen pankreatischen RAS, wobei Renin und ACE am Biosyntheseweg der Angiotensin Peptide beteiligt sind. Ihre geringe Aktivität im pankreatischen Gewebe deutet jedoch auf alternative Abbauege hin. Inselzelltumore und Zelllinien aus Inselzelltumoren, wie die RIN-r^{iv} Zelllinie, weisen eine deutlich höhere Angiotensinogen mRNA-Expression auf. Dies könnte ein Indiz für die prokarzinogenen Effekte eines aktiven RAS sein^[24-26]. Außerdem zeigten Reddy et al., dass ACE Inhibition die Mitose und Gen-Expression von Inselzellen moduliert^[27].

^{iv} RIN = Rat insulinoma

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 et al. 1986
	-	-	-	-	+?	+?	-	Ghiani & Masini et al. 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 et al. 2002
Maus (isolierte Inseln)	-	+	+	-	+	+	-	Lau et al. 2004
	-	-	-	-	+	-	-	Chu et al. 2006
Mensch (isolierte Inseln)	-	-	-	-	-	-	+	Kobayashi et al. 2004
	-	+	+	-	+	-	-	Ramracheya et al. 2006
	-	+	+	-	+	-	-	Lupi et al. 2006
Ratte (isolierte Inseln)	-	-	-	-	-	-	+	Kobayashi et al. 2004
Ratte (isolierte Azinuszellen)	-	-	+	-	+	+	-	Tsang et al. 2004
MIN-6 Zellen ^v	-	-	-	-	+	-	-	Ramracheya et al. 2006
INS-1 Zellen	-	-	-	-	-	-	+	Siebelmann et al.
CFPAC-1 Zellen ^{vi}	-	-	-	-	+	-	-	Fink et al. 2002
RIN-m, RIN-14B	-	-	-	-	-	+	-	Wong et al. 2004
AR4-2J ^{vii}	-	-	-	-	+	+	-	Chappel et al. 1995
	-	-	-	-	+(a)	-	-	Cheung et al. 1999
Pankreatische Sternzellen der Ratte	-	-	-	-	+	-	-	Ko et al. 2006

Abbildung 1-4: Bestandteile des pankreatischen RAS

Übernommen und ergänzt von Wensing et al.^[28]

^v MIN = Mouse insulinoma

^{vi} CFPAC = Cystic fibrosis pancreatic adenocarcinoma

1.3.1 Das RAS des exokrinen Pankreas

Chappel et al. wiesen erstmalig Komponenten eines gewebsspezifischen RAS im Gesamtpankreas des Hundes nach. So gelang zum einen der Nachweis von AGT und ANG II, als auch der Nachweis hochaffiner Bindungsstellen für das Octapeptid ANG II^[29, 30].

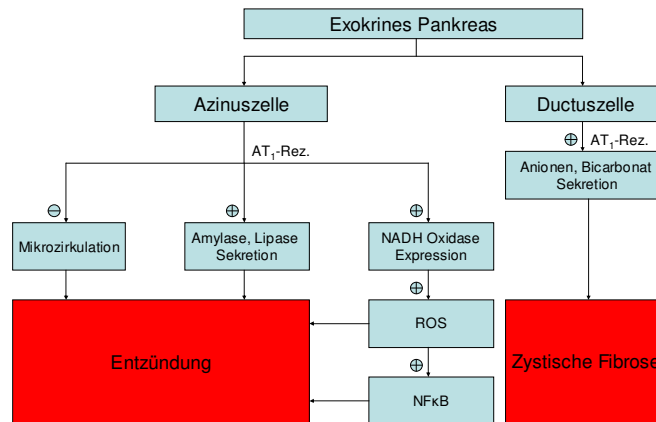


Abbildung 1-5: Physiologische und pathophysiologische Funktionen des exokrinen pankreatischen RAS.

Der Nachweis von ANG I und Renin blieb allerdings ergebnislos. In der Azinuszelllinie AR4-2J und in isolierten Azinuszellen des Rattenpankreas konnten neben Renin und Angiotensinogen auch ACE sowie der AT_{1a}-, AT_{1b}- und AT₂- Rezeptor identifiziert werden^[31, 32]. Diese Ergebnisse konnten von Regoli et al. im Rattenpankreas nicht bestätigt werden. Hier fand sich Angiotensinogen ausschließlich in Glukagon-sezernierenden Zellen in Randgebieten der Langerhans-Inseln. Sie sezernieren es in den Pankreassaft^[26], wo es die Sekretion von Azinus- und Ductusepithelzellen beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass ANG II Ca²⁺-abhängig die Bicarbonatsekretion von Ductusepithelzellen über den AT₁-Rezeptor steigert^[33]. Captopril hingegen hemmt die Bicarbonatsekretion bei Hunden^[34]. In Azinuszellen steigert ANG II die Amylase- und Lipasesekretion und regt die Bildung von Inositol-1,3,4,-trisphosphat an. Auch dieser Effekt wird über den AT₁-Rezeptor vermittelt, da er sich mit Losartan, einem AT₁-Rezeptorantagonisten, aufheben lässt^[31, 35]. AT₂-Rezeptorantagonisten (CGP42112, PD123319) können die durch ANG II-induzierte Sekretionssteigerung nicht antagonisieren. Bei einer erhöhten Aktivität des pankreatischen RAS steigt die Wahrscheinlichkeit, an einer akuten Pankreatitis oder an Bauchspeicheldrüsenkrebs zu erkranken^[25, 36]. Im Rattenmodell schützt so der AT₁-Rezeptorantagonist Losartan vor einer Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis^[37]. Diese proinflammatorische Eigenschaft von ANG II scheint über eine Aktivierung des AT₁-Rezeptors vermittelt zu sein, bei der es NAD(P)H-Oxidase-abhängig zur Bildung von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) kommt und somit die Bildung des Nuklearen Faktors-kappa B (NFκB)

induziert wird, welche die Inflammation des Pankreas unterhält^[38]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Blockade des RAS bei einer inflammatorischen Erkrankung des Pankreas, wie Pankreatitis und Fibrose, sinnvoll erscheint. In Abbildung 1-5 sind die geschilderten pathophysiologischen Zusammenhänge eines aktivierten RAS im exokrinen Pankreas schematisch dargestellt.

Die Bedeutung des AT₂-Rezeptors im exokrinen Pankreas ist nicht bekannt. Die Existenz des AT₄-Rezeptors wurde noch nicht nachgewiesen.

1.3.2 Das RAS des endokrinen Pankreas

Viele Studien belegen, dass alle Komponenten eines lokalen bzw. intrinsischen RAS im endokrinen Pankreas vorhanden sind^[29, 39-41]. Die Aktivität dieses intrinsischen RAS wird aber anscheinend auf anderem Wege reguliert, als die des systemischen RAS^[42]. Deutlich wird dies bei Diabetes- oder Bluthochdruckpatienten, die in der Regel nicht durch erhöhte Plasma-Renin- oder ANG II-Spiegel auffallen. Die nachgewiesenen Komponenten sind in Abbildung 1-6 dargestellt.

- **Renin**

Der direkte (Pro)Renin-Proteinnachweis gelang immunozytochemisch im endokrinen Pankreas ausschließlich in der β -Zelle. Die (Pro)Renin mRNA hingegen findet sich in der β -Zelle nur in sehr geringen Mengen. Vermutlich nimmt die β -Zelle Renin aus dem Interstitium der Inselzellen auf, nachdem es aus retikulären Fibroblasten dorthin sezerniert wurde. In diesen Geweben gelang auch der Nachweis der (Pro)Renin mRNA^[40] in größeren Mengen. Die zelluläre Internalisierung des (Pro)Renins wurde 1996 von Sealey beschrieben^[43]. Weiterhin existiert eine aktive intrazelluläre Form des Enzyms, die durch alternatives Splicing des Reningens nicht sezerniert werden kann.

RAS-Komponente	Vorkommen	Lokalisation	Literaturnachweis
(Pro)Renin	+	β -Zellen	[40]
AGT	+	α -Zellen	[26]
ACE1	+	Langerhans-Inseln	[44, 45]
ACE-2	+	β -Zelle	[26]
ANG I	-	-	-
ANG II	+	Gefäßendothel	[46]
ANG III	+	-	[29]
ANG IV	-	-	-
AT ₁ -Rezeptor	+	β -Zelle	[40], [29]
AT ₂ -Rezeptor	+	δ -Zelle	[40], [41]
AT ₄ -Rezeptor	+	Langerhans- Inseln	[46]
Mas-Rezeptor	-	-	-

Abbildung 1-6: Nachgewiesene Komponenten eines RAS innerhalb der Langerhans-Inseln

- **Angiotensinogen**

Angiotensinogen mRNA wurde in humanen Inselzellen^[44] und in der RIN-r Zelllinie, die aus einem Inselzelltumor des Rattenpankreas hervorging, entdeckt^[47]. Die Expression konnte durch Dexamethason, einem Glukocorticoid, induziert werden. Angiotensinogen selbst konnte im Rattenpankreas in α -Zellen immunozytochemisch nachgewiesen werden. Die Speicherung und Sekretion des Proteins erfolgt unabhängig der Glukagonsekretion mittels eines spezialisierten Sekretions-Pathways^[26].

- **ACE 1 und ACE-2**

Die ACE-1-Expression und -Aktivität ist in humanen Inselzellen detektierbar^[44]. Kapillaren und peripher gelegene Zellen der Inseln weisen größere Anteile ACE-1 auf. ACE-2 mRNA und Protein konnten bei Sprague-Dawley Ratten in der β -Zelle identifiziert werden^[45]. ACE-2 spaltet als Carboxypeptidase vor allem ANG I zu ANG 1-9 und ANG II zu ANG 1-7

- **Angiotensin Rezeptoren**

Sowohl AT₁- als auch AT₂-Rezeptor werden in den Langerhans-Inseln exprimiert. Der AT₁-Rezeptor ist sowohl in der β -Zelllinie MIN-6 als auch in den im Zentrum der Inseln lokalisierten humanen und murinen Insulin sezernierenden β -Zellen nachgewiesen worden^[41, 44]. Der AT₂-Rezeptor, der im Vergleich zum AT₁-Rezeptor 9 fach stärker im Gesamtpankreas vertreten ist^[48], wird hingegen in Somatostatin-sezernierenden δ -Zellen exprimiert. Diese sind in peripheren Bereichen der Langerhans-Inseln lokalisiert^[49]. Angiotensin II moduliert also über den AT₂-Rezeptor die Freisetzung von Pankreashormonen durch die Regulation der Somatostatinsekretion. Offen ist die Existenz des G-Protein-gekoppelten Mas-Rezeptors. Ein endogener Ligand dieses Rezeptors ist das Heptapeptid ANG 1-7. Weiterhin konnte die Verbreitung des AT₄-Rezeptors in humanen Inselzellen dargestellt werden^[46].

- **Angiotensin Peptide**

ANG II ist im Endothel der Kapillaren nachgewiesen worden; es liegt hier lokal in höheren Konzentrationen vor als im systemischen RAS, wo es bei gesunden Lebewesen in Konzentrationen von 5 pM vorliegt. In den Inselzellen selbst wurde es noch nicht identifiziert^[50]. Aus ANG II kann durch divergierende Abbauege ANG III und ANG 1-7 gebildet werden. Beide Peptide sind im Pankreas beschrieben^[29].

1.3.2.1 Mögliche Rolle des RAS im Endokrinen Pankreas

Die Präsenz eines funktionierenden lokalen RAS im endokrinen Pankreas wird durch zahlreiche Studien belegt. Die physiologische Rolle, die dieses RAS dort spielt ist jedoch weitgehend ungeklärt.

Eine Reihe klinischer Studien, in denen ACE-Hemmer oder

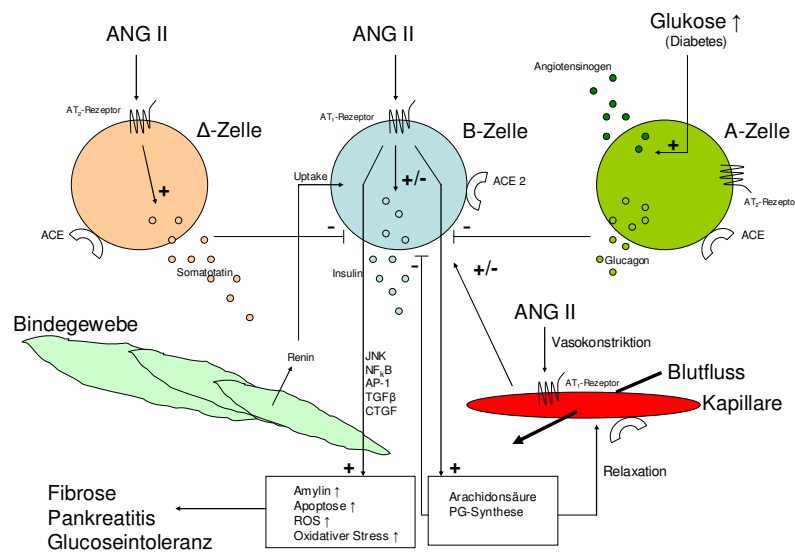


Abbildung 1-7 : Die physiologische Rolle des endokrinen pankreatischen RAS

AT₁-Rezeptorantagonisten untersucht wurden, wie z.B. im Captopril Prevention Project (CAPPP), der Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) oder der Losartan Intervention For Endpoint reduction (LIFE) zeigten, dass die Blockade des RAS mit ACE-Inhibitoren oder AT₁-Rezeptorantagonisten die Diabetesinzidenz reduziert. Die Senkung der Inzidenz wird in erster Linie einer gesteigerten Insulinsensitivität peripherer Gewebe zugeschrieben.

Dass durch eine Blockade des RAS auch direkte Effekte auf die β -Zellfunktion ausgeübt werden, scheint wahrscheinlich. So zeigen Bluthochdruckpatienten, die über einen langen Zeitraum mit ACE-Inhibitoren behandelt werden, eine verbesserte Glukosesensitivität.

Untersuchungen am perfundierten Rattenpankreas zeigen, dass lokal gebildetes ANG II im endokrinen Pankreas durch Vasokonstriktion der Kapillaren signifikant die Durchblutung der Inselzellen vermindert. Diese Vasokonstriktion verzögert die erste Phase der Glukose-induzierten Insulinsekretion^[51]. AT₁-Rezeptorantagonisten oder ACE-Hemmer steigern hingegen den pankreatischen Blutfluss. Eine gesteigerte Durchblutung der Inselzellen fördert das Ansprechen der β -Zelle auf Blutglukose. D.h. die Glukosesensitivität wird gesteigert^[51, 52] und die initiale Insulinsekretion verbessert^[53].

Die Rolle, die ANG II in der β -Zellregulation spielt, wird kontrovers diskutiert. In Versuchen an isolierten murinen Inselzellen zeigt ANG II dosisabhängig eine

Hemmung der Glukose-induzierten Insulinsekretion^[54], die durch den AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan aufgehoben werden kann. Als mögliche Ursache führen die Autoren eine verminderte (Pro)Insulinbiosynthese an, die durch die Aktivierung des AT₁-Rezeptors ausgelöst wird.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der oben genannten Studie sind Untersuchungen an isolierten humanen und murinen β -Zellen sowie an MIN 6 Zellen, einer insulinsezernierenden Insulinoma Zelllinie, zu sehen. Hier kommt es nach ANG II-Gabe zu einer kurzfristigen Steigerung der basalen (2 mM) sowie der Glukose-abhängigen (8 und 16,7 mM) Insulinsekretion^[44]. Auch eine chronische ANG II-Gabe über 4 Wochen erhöht bei Mäusen den Seruminsulinspiegel und führt zu einer schnelleren Glukose-Clearance nach einer Glukose-Bolusgabe^[55].

ANG II moduliert also über Interaktion am AT₁-Rezeptor sowohl die Gefäßweite der Inselzellkapillaren als auch die Insulinsekretion der β -Zelle. Zusätzlich bleibt zu berücksichtigen, dass ANG II über den AT₂-Rezeptor die Somatostatinsekretion der δ -Zelle steigert^[49]. Somatostatin hemmt, wie auch Glukagon, auf parakrinem Weg die Insulinsekretion der β -Zelle^[56].

ANG II beeinflusst außerdem die Prostaglandinsynthese^[57]. Da im Pankreas, anders als in anderen Geweben, hauptsächlich die induzierbare Cyclooxygenase 2 (COX 2) exprimiert wird, könnte auch in den Inselzellen die Prostaglandinsynthese durch ANG II induziert werden. Von besonderem Interesse ist dabei die Bildung von Prostaglandin E₂ (PGE₂), welches über Prostanoidrezeptoren die Insulinsekretion beim Menschen senkt und so eine Glukoseintoleranz fördert^[58].

Über verschiedene Mechanismen scheint ANG II demnach eine Glukoseintoleranz sowie eine β -Zelldysfunktion zu fördern und so die Entstehung von Typ 2 Diabetes zu unterstützen. In Abbildung 1-7 sind die ANG II-Wirkungen im endokrinen Pankreas schematisch zusammengefasst.

Der fortschreitende Funktionsverlust der Inselzellen wird zusätzlich durch die ANG II-induzierte NAD(P)H-abhängige Bildung von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS)^[38] unterhalten, die durch eine AT₁-Rezeptorblockade aufgehoben werden kann^[36]. Die Aktivierung des Transforming Growth Faktor- β (TGF- β)^[59] und Induktion der Transkriptionsfaktoren c-Jun-N-terminal Kinase (JNK)^[60], Aktivator Protein-1 (AP-1) und NF κ B^[61] fördern die entzündlichen Prozesse, die langfristig zu einer fibrotischen Veränderung des Pankreasgewebes führen und eine Pankreatitis sowie eine verminderte Glukosesensibilität der β -Zelle zur Folge haben können.

Dauerhaft erhöhte Blutglukosespiegel führen im Tiermodell neben einer vermehrten AGT-Bildung zu einer gesteigerten Expression des AT₁-Rezeptors sowie der Schlüsselenzyme ACE-1 und ACE-2 in den Inselzellen des Pankreas^[59, 62].

Interessanterweise sind Studien veröffentlicht worden, die zeigen, dass unter einer RAS-Blockade das Risiko von Hypoglykämien erhöht ist. So ist in einer Studie an 6649 diabetischen Patienten das Risiko einer Hypoglykämie in der Patientengruppe, die mit ACE-Hemmern behandelt wurde, 4-fach erhöht^[63].

Euglykämische Typ 1 Diabetiker weisen allerdings auch ein übermäßig aktiviertes RAS auf^[64].

Zwei Metaanalysen zeigen, dass die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes durch eine Blockade des RAS bei Risikopatienten aufgehalten werden kann^[65, 66]. In der Navigator Studie (Nataglinid and Valsartan in Impaired Glucose Tolerance Outcome Research) konnte der Zusammenhang zwischen dem kardiovaskulären Risiko und dem Typ 2 Diabetes bzw. einem latenten Prädiabetes bestätigt werden. Die noch nicht abgeschlossene Studie soll zeigen, wie stark das Typ 2 Diabetesrisiko bei 390000 Hochrisikopatienten durch eine RAS-Blockade gesenkt werden kann. In Otusuka Long Evans Tokushima Fatty-Ratten (OLETF) und ZDF-Ratten konnte eine RAS-Blockade die initiale Insulinsekretion verbessern, die β -Zellmasse nahm zu und die Zellmorphologie normalisierte sich; außerdem kam es zu einer Abnahme an Inselzellfibrosen^[59].

Die Rolle des AT₄-Rezeptors im endokrinen Pankreas ist bislang nicht untersucht worden.

1.3.3 Intrazelluläres RAS

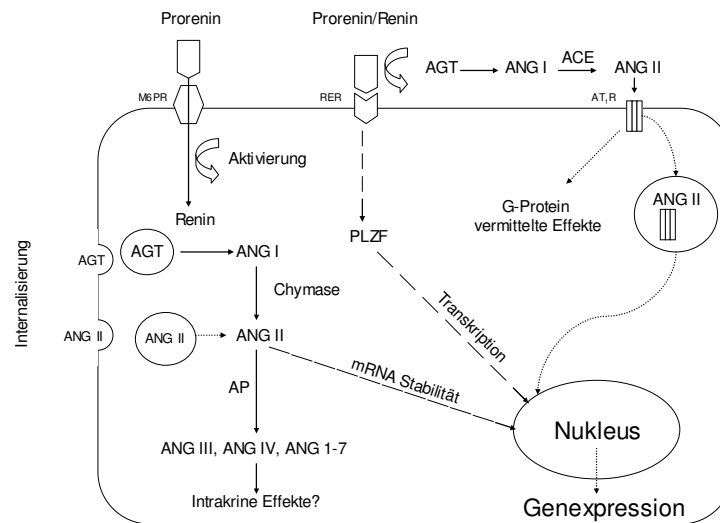


Abbildung 1-8 : Komponenten des intrazellulären RAS und deren mögliche physiologische Bedeutung

Ein intrazelluläres RAS ist durch das endogene Vorkommen der spezifischen Komponenten innerhalb einer Zelle gekennzeichnet. Betrachtet man diese RAS-Komponenten genauer, sind sie als Transmembranenzyme (ACE, IRAP) und als Peptide, die durch endständige Signalpeptidsequenzen dem Exozytosemechanismus der Zelle zugeführt werden, für ein intrazelluläres System eher nicht geeignet. Nach der Entdeckung von unterschiedlich glykosylierten und teilweise nicht glykosylierten AGT-Isoformen^[67, 68], alternative Spleißvarianten des Renins^[69, 70], sezernierten und intrazellulären ACE-Formen^[71] sowie weiteren ANG II bildenden Enzymen, wie z.B. Chymase^[72] und Cathepsin^[73], wächst die Hypothese eines vollständigen intrazellulären RAS. Der denkbare schematische Aufbau dieses intrazellulären RAS ist in Abbildung 1-8 dargestellt.

Nicht glykosyliertes AGT verbleibt innerhalb der Zelle oder reichert sich im Nukleus an. Intrazelluläres Renin stammt entweder aus lokaler Synthese und/oder aus der Internalisierung aus dem Extrazellulärraum, wobei glykosyliertes Renin über den M6P-Rezeptor aufgenommen wird. (Pro)Renin gelangt über bislang nicht weiter beschriebenen Rezeptoren in die Zelle und wird hier zu Renin aktiviert^[7].

ACE spielt für die intrazelluläre Bildung von ANG II vermutlich nur eine untergeordnete Rolle. Für die intrazelluläre Bildung von ANG II kommen eher

Chymasen in Frage. Hohe Glukosespiegel führen zu einer Zunahme der Chymaseaktivität innerhalb der Zelle und somit zu einem Anstieg der ANG II-Konzentration. In Mesangiumzellen der Ratte konnte allerdings auch eine Kolokalisation von ACE und ANG II im Bereich des Zytosol und auch im Nukleus beobachtet werden.

Neben der Rezeptor-abhängigen Internalisierung von ANG II, die durch Candesartan, einem AT₁-Rezeptorantagonisten, gehemmt werden kann, wird die intrazelluläre Bildung von ANG II im Nieren-, Leber-, Gefäßzellen sowie dem Herzmyokard beschrieben^[74]. Die Existenz spezifischer Bindungsstellen in der Zelle ist unklar. Bekannt ist eine AT₁-Rezeptor-ähnliche Bindungsstelle im Nukleus sowie eine Chromatinbindungsstelle. Neueste Untersuchungen zeigen, dass ANG II vor allem die mRNA-Stabilität erhöht. Die so geschützte mRNA kann an den Ribosomen über einen längeren Zeitraum in das Protein transkribiert werden^[75]. ANG II bindet an so genannten AU-reichen Regionen (AREs) der mRNA und schützt zusammen mit anderen Proteinfaktoren vor einer Degradation der mRNA. Zusätzlich moduliert ANG II die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration sowie verschiedene Zellwachstumsvermittelnde Proteinkinasen (ERK, PI3K). AT₁- und AT₂-Rezeptorantagonisten können das durch ANG II ausgelöste Zellwachstum zum Teil inhibieren. Dies spricht für die Beteiligung von atypischen intrazellulären ANG II-Rezeptoren^[76]. Jedoch spielen auch AT-Rezeptor-unabhängige Mechanismen eine Rolle, da in CHO Zellen die ANG II-induzierte Zellproliferation durch ARB nicht beeinflusst werden konnte.

Aus pathophysiologischer Sicht interessant ist das Ergebnis einer Untersuchung von Vidotti et al. an Mesangiumzellen der Ratte. Hohe Glukosekonzentrationen führen in dieser Studie zu einer Steigerung der Reninaktivität, zu einer Senkung der zellulären Reninsekretion sowie zu einer Erhöhung der Pro(renin), Cathepsin B, Angiotensinogen- und ACE-Expression^[77]. Gesteigerte ANG II-Level führen durch den oben beschriebenen Mechanismus intrazellulär zu einer erhöhten Expression der Wachstumsfaktoren IGF, TGF- β und PDGF und der Protoonkogene, wie z.B. c-Jun. Weiterhin werden auch Komponenten des RAS (ACE, Renin) durch ANG II verstärkt exprimiert.

Bei Patienten mit Diabetes mellitus würde ein überaktives intrazelluläres RAS, ausgelöst durch erhöhte Blutglukosespiegel, das Risiko einer Hypertrophie des Herzmyokards erhöhen. Diese These wird von Frustaci et al. unterstützt. Die Untersuchungen in kardialen Myozyten von diabetischen Patienten zeigen eine

gesteigerte intrazelluläre ANG II-Bildung, bedingt durch eine erhöhte Renin-Bildung^[78]. Dieser Effekt fällt bei Patienten mit Diabetes plus Bluthochdruck noch ausgeprägter aus. Die gesteigerte ANG II-Bildung geht mit der Hypertrophie des Myokards, dem Funktionsverlust und dem Zelltod einher^[79].

Das Vorkommen weiterer Komponenten eines IRAS sind wahrscheinlich. Vor allem der in manchen Geweben hauptsächlich intrazellulär lokalisierte AT₄-Rezeptor könnte eine wichtige Funktion einnehmen. Wirkungen, die bisher ANG II zugeschrieben wurden, aber nicht mit AT_{1/2}-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden konnten, könnten durch den Metaboliten ANG IV, für den auch Internalisationsmechanismen beschrieben sind, vermittelt werden^[80].

1.4 Zink-abhängige Aminopeptidasen

Enzyme	<i>In Vitro</i> -Substrat	Inhibitor
Aminopeptidase A	ANG II, CCK 8	EC 33, Gluthiol, Amastatin, RB150
Aminopeptidase N	ANG III, ANG IV, Substanz P Enkephaline, Kallidin	PC 18, EC 27, Amastatin
Thyreotropin-releasing hormone-degrading enzyme	Thyreotropin	CPPHNA, Glp-Asn-Pro-Asn
Leukotrien A4 Hydrolase	Enkephalin, Dynorphin	SC-57461A
Aminopeptidase B	Thymopentin, Glukagon, Kallidin-10, Enkephalin, Neurokinin A, Somatostatin, ANG III	-
Adipocyte-Derived Leucine Aminopeptidase	ANG II, ANG III, ANG IV, Kallidin, peptidische Antigene	-
Leukocyte-Derived Arginine Aminopeptidase	Kallidin, ANG III, peptidische Antigene	-
Puromycin-Sensitive Aminopeptidase	Dynorphine, Endorphine, CCK, Enkephaline	-
Aminopeptidase Q	ANG III, Kisspeptin-10 und Endokinin C	Bestatin
Aminopeptidase O	ANG III	
Insulin regulated Aminopeptidase (IRAP)	Oxytocin, Vasopressin, Somatostatin, CCK 8, Neurokinin A, Neurokinin B, Lys-Bradykinin, Dynorphin A, ANG III, ANG IV	ANG IV, Norleucin-ANG IV, LVV-Hemorphin-7

Abbildung 1-9: Die Familie der Zink-abhängigen Aminopeptidasen, dargestellt mit Substrat und spezifischem Inhibitor der Aminopeptidasefunktion.

1.4.1 Die M1-Familie der Zink-abhängigen Aminopeptidasen

Aminopeptidasen katalysieren als Exopeptidasen die Abspaltung einzelner AS am N-Terminus verschiedener Proteine und spielen so eine bedeutende Rolle bei der Bildung und den Abbau bioaktiver Peptide. Je nach Struktur der Zinkbindungsstelle unterscheidet man fünf Kategorien von Aminopeptidasen^[81]. Die für unsere Forschung interessante IRAP gehört als Metalloprotease zur Superfamilie der

Zinkine, die durch das HEXXH (Histidin-Glutamat-X-X-Histidin)-Motiv charakterisiert wird. Dieses Motiv beinhaltet zwei Histidinreste, die für die Komplexierung des Zinkions verantwortlich sind. Ein C-terminaler Glutamatrest, 19 AS entfernt vom HEXXH-Motiv, wurde als dritter Zink-Ligand identifiziert^[81] und dient der Unterscheidung zwischen Gluzinkinen (Clan MA; M steht hier für den Hauptbestandteil des katalytischen Zentrums, dies ist für Metalloproteasen in der Regel Zink; A beschreibt den spezifischen Clanbuchstaben und beschreibt die evolutionsbedingte Verwandtschaft zu einem gemeinsamen Vorläuferprotein des Clans^[82]) und Metzinkinen (Clan ME). Metzinkine zeigen das erweiterte Zinkbindungsmotiv HEBXHXGBGXH. Der Clan der Gluzinkine kann weiter in die M1-Familie aufgegliedert werden. Sie umfasst alle Exopeptidasen und ist durch das Zink-Bindungsmotiv HEXXH₁₈E charakterisiert. Auch das Exopeptidasemotiv (GXMEN) ist bei den Mitgliedern der M1-Familie sehr stark konserviert und kann zur Unterscheidung zwischen anderen Gluzinkinen dienen. Das im Zinkbindungsmotiv komplexierte Zn²⁺ fungiert bei den Metalloproteasen zum einen als Regulator der Aminopeptidasefunktion, kann zum anderen aber auch die Aminopeptidasefunktion aktivieren bzw. inhibieren. Für die Blutzuckerregulation spielt vor allem die Dipeptidylpeptidase eine Rolle, die als Aminopeptidase für den Abbau der Inkretine GIP und GLP verantwortlich ist. Fehler in der Regulation der Peptidaseaktivität können daher mit Erkrankungen wie Krebs, Herz-Kreislauf-Beschwerden oder Diabetes assoziiert sein ^[83]. IRAP gehört zur M1-Familie der Zink-abhängigen Aminopeptidasen oder auch Gluzinkine. Im menschlichen Gewebe sind zur Zeit elf Mitglieder dieser Familie identifiziert^[83]. Sie werden im Folgenden näher charakterisiert. Eine Übersicht gibt Abbildung 1-9.

1.4.1.1 Aminopeptidase A (APA)

APA ist ein 160 kDa schweres Typ II-Transmembranprotein und wird in großen Mengen in Bürstensaummembranen des Dünndarms, im proximalen Tubulus der Niere und im Gefäßendothel exprimiert. Im Gehirn ist APA in Regionen lokalisiert, die für die Kreislaufkontrolle eine Rolle spielen. APA hydrolysiert saure AS-Reste am N-Terminus biologisch aktiver Peptide, wie ANG II^[84] (hier den Aspartatrest) und Cholezystokinin-8^[85]. Zentral wirksame APA-Inhibitoren, wie die Substanz EC 33, zeigen in der Ratte antihypertensive Eigenschaften. Vermutlich ist die Spaltung von ANG II zu ANG III für den Blutdruckanstieg essentiell^[86].

1.4.1.2 Aminopeptidase N (APN)

APN ist ein Typ II membrangebundenes 150 kDa schweres Protein^[87]. Exprimiert wird dieses Protein, wie die APA, in Bürstensaummembranen des Dünndarms und in der Niere. In geringeren Mengen kommt APN auch in anderen Geweben einschließlich dem Gehirn vor. APN katalysiert die N-terminale Spaltung basischer und neutraler AS vieler bioaktiver Peptide. Diese Degradation führt zur Inaktivierung dieser Peptide oder aber zur Bildung neuer pharmakologisch aktiver Abbauprodukte. Bekannte Substrate der APN sind die vasoaktiven Peptide Kallidin, Substanz P und verschiedene Enkephaline. ANG III^[84] und ANG IV^[88], als bioaktive Peptide des RAS, werden ebenfalls durch APN abgebaut. APN spaltet die N-terminale AS Arginin von ANG III und generiert so das Hexapeptid ANG IV. Die Substanzen EC 27 ($K_i = 32 \text{ nM}$) und PC 18 ($K_i = 8 \text{ nM}$) inhibieren selektiv die APN. Um die substanzspezifischen Wirkungen der einzelnen Angiotensin Peptide zu charakterisieren, können die oben genannten Inhibitoren eingesetzt werden. Durch Gabe von EC 27 oder PC 18 kann die zentrale Vasopressinfreisetzung gesteigert werden, wohingegen sie durch Gabe von EC 33 gesenkt wird. Es wird deutlich, dass die Spaltung von ANG II zu ANG III bedeutsam für die Vasopressinsekretion ist^[84]. In Ratten führt die intrazerebroventrikuläre Injektion von PC 18 zu einem Anstieg der durch ANG III-induzierten Blutdrucksteigerung. Der unselektive AT-Rezeptorantagonist Losartan hebt diesen Blutdruckanstieg wieder auf, dem gegenüber hat ein selektiver AT₂-Rezeptorantagonist (PD 123319) keinen Einfluss^[86]. Es wird deutlich, dass durch eine Verlängerung der Halbwertszeit des Heptapeptids ANG III seine physiologische Wirkung auf den AT₁-Rezeptor verlängert und verstärkt wird.

Look et al. stellten fest, dass es sich bei APN und CD13 (human lymphocyte surface cluster of differentiation antigen 13) um identische Proteine handelt. APN / CD13 moduliert die Proliferation und Funktion von T-Zellen. Durch die Inhibierung von APN kommt es zu einer Suppression der DNA-Synthese in aktivierten T-Zellen^[89], außerdem sind immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkungen beschrieben^[90]. Monoklonale APN / CD13 Antikörper unterdrücken zusätzlich die Tumormetastasierung^[91]. Nicht-peptidische APN-Inhibitoren sind unter diesem Aspekt ein interessantes Target für die pharmazeutische Chemie.

1.4.1.3 Thyreotropin-releasing hormone-degrading Ectoenzyme (TRH-DE)

TRH-DE ist eine Pyroglutamyl-Peptidase. Im Gegensatz zu anderen Aminopeptidasen ist TRH-DE sehr substratspezifisch. Die Peptidase katalysiert als einziges Enzym die Spaltung der N-terminalen Pyroglutamylgruppe des Thyreotropin-releasing Hormons (TRH). Exprimiert wird sie hauptsächlich im ZNS, in geringeren Mengen auch in der Retina, Lunge und Leber.

1.4.1.4 Leukotrien-A4-Hydrolase (LTA4H)

Die LTA4H ist ein zytosolisches Protein, das in vielen Geweben vertreten ist. Als bifunktionelles Enzym besitzt LTA4H zusätzlich zur Aminopeptidasefunktion eine Epoxid-Hydrolase-Aktivität mit einer hohen Affinität zu LTA4. Die Spaltung des Epoxides LTA4 ist der finale Schritt im 5-Lipoxygenase-Pathway und führt zur Bildung des Chemokines LTB₄^[92]. *In vivo*-Substrate der Aminopeptidasefunktion von LTA4H sind nicht bekannt, *in vitro* spaltet die Peptidase Enkephalin und Dynorphin^[93]. Therapeutisch ist die Entwicklung von LTA4H-Inhibitoren (z.B. SC-57461A) interessant, da so die Bildung des proinflammatorischen LTB₄ verhindert werden kann.

1.4.1.5 Aminopeptidase B (APB)

APB spaltet selektiv basische AS-Reste, wie Lysin- und Argininreste, am N-terminalen Peptidende. Endogene Substrate sind Thymopentin^[94], Kallidin-10, Enkephalin, Neurokinin A^[95] und Arg(-1)-Lys(0)-Somatostatin-14^[96]. Als sekretorisches Enzym wird die APB von vielen Geweben exprimiert und sezerniert; hier sind z.B. T-Lymphozyten^[94] und Phäochromozytom Zellen (PC 12)^[97] zu nennen. Das breite Verteilungsmuster von APB deutet darauf hin, dass es sich bei dem Peptid um ein Enzym handelt, welches eine Rolle bei der Prozessierung von Prohormonen spielt und so verschiedene physiologische Vorgänge beeinflusst. Glukagon konnte ebenfalls als Substrat von APB identifiziert werden. APB prozessiert Glukagon in das C-terminale Fragment 19-29. Dieses Fragment ist als Miniglukagon bekannt und weist gegensätzliche Wirkungen zum Glukagon auf; so hemmt es z.B. die Insulinsekretion der β -Zelle^[98]. Ein spezifischer Inhibitor ist bislang nicht bekannt.

1.4.1.6 Adipocyte-Derived Leucine Aminopeptidase (A-LAP)

Das lösliche zytosolische Protein A-LAP spaltet N-terminale Leucin-Reste. *In vitro*-Substrate sind ANG II, ANG III und ANG IV sowie Kallidin^[99]. A-LAP wurde zunächst in humanen Adipozyten entdeckt, aber auch in Niere, Lunge, Thymus, Milz und Nebenniere ist es in größeren Mengen vorhanden. Vermutlich nimmt A-LAP durch Abbau der oben genannten Substrate auf die Blutdruckregulation Einfluss. Cui et al. identifizierten A-LAP als Typ II Membranprotein. A-LAP ist mit dem Typ 1 Tumor Nekrose Faktor Rezeptor-1 (TNFR-1) kolokalisiert. Die Peptidase reguliert die Aktivität des TNFR-1. Durch die Bindung an den Rezeptor reguliert A-LAP die proteolytische Spaltung des Rezeptors durch eine Sheddase. A-LAP ist somit für das Ausmaß der Rezeptorexpression an der Membran ausschlaggebend. Ähnliches gilt für den IL-6 und IL-1 Rezeptor^[100]. Von Bedeutung ist die Funktion von A-LAP bei der Prozessierung von Antigenen in tumorösen und bakteriell infizierten Körperzellen. A-LAP schneidet als Enzym des Endoplasmatischen Retikulums (ER) artfremde oder tumorspezifische Peptide so zu, dass sie von Major-Histinkompatibilitäts-Komplexen Klasse-1 (MHC-1) an der Zelloberfläche präsentiert und von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden können. Zytotoxische T-Lymphozyten leiten nach Erkennung des peptidischen Antigens die Apoptose der infizierten Zelle ein^[101].

1.4.1.7 Leukocyte-Derived Arginine Aminopeptidase (L-RAP)

L-RAP ist ein Protein der luminalen Seite des ER. Abhängig von der Spleißvariante besteht es aus 960 oder 532 AS. Bei der kurzen Spleißvariante fehlt allerdings die Aminopeptidaseaktivität. In erster Linie spaltet L-RAP basische AS, wie Arginin und Lysin am N-Terminus von Peptiden. Vermutlich ist L-RAP, wie auch A-LAP, für das Zuschneiden von peptidischen Antigenen im ER verantwortlich. Diese peptidischen Antigene werden dann über MHC-1 den immunkompetenten Zellen präsentiert. *In vitro*-Substrate der L-RAP sind ANG III und Kallidin^[102].

1.4.1.8 Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA)

PSA, ein 100 kDa schweres monomeres Protein^[103], zeigt eine breite Gewebsverteilung^[104]. Durch unterschiedliche Translation des PSA-Gens entstehen zwei Varianten der Peptidase. Eine Gehirn-spezifische membranständige Form^[104] und eine zytosolische Form des Proteins^[103]. *In vitro* spaltet PSA Enkephaline sowie

verschiedene Neuropeptide, wie z.B. Dynorphin, Endorphin, Cholecystokinin und Somatostatin^[105-107]. *In vivo*-Substrate sind nicht bekannt; wie bei A-LAP und L-RAP wird angenommen, dass PSA bei der Prozessierung von peptidischen Antigenen beteiligt ist^[108].

1.4.1.9 Aminopeptidase Q (APQ, Laeverin)

Das Protein APQ wird spezifisch an der Zelloberfläche von Trophoblasten exprimiert. Trophoblasten umgeben als äußere Zellschicht den Embryo und versorgen ihn mit Nährstoffen. Durch enzymatische Prozesse an der Oberfläche der Trophoblasten wird die Gebärmutterschleimhaut porös und durchlässig, so dass sich der Embryo in die Gebärmutterschleimhaut eingraben kann. Im Laufe der Schwangerschaft entwickelt sich aus dem Trophoblasten die Fruchthülle und der embryonale Teil der Plazenta. APQ spaltet N-terminal als Leucyl-Aminopeptidase ANG III, Kisspeptin-10 und Endokinin C. Bestatin inhibiert die Aminopeptidaseaktivität^[42].

1.4.1.10 Aminopeptidase O (APO)

APO ist eine M1-Metalloprotease, die im menschlichen Gehirn exprimiert wird. Ihr katalytisches Zentrum weist sowohl die Zn²⁺-Bindungsstelle (HEXXE(X)₁₈E), als auch das katalytische Zentrum (GAMEN-Motiv) als die charakteristischen Merkmale der Zink-abhängigen Aminopeptidasen auf. Beide Bereiche sind in allen Aminopeptidasen restriktiv konserviert. Rekombinant hergestellte APO spaltet *in vitro* ANG III zu ANG IV^[83].

1.4.1.11 Insulin regulierte Aminopeptidase (IRAP)

Die Insulin regulierte Aminopeptidase wird im nachfolgenden Kapitel ausführlich besprochen.

1.5 Insulin regulierte Aminopeptidase (IRAP)

	NCBI UniGene	Synonym	Organismus
Insulin regulated aminopeptidase (IRAP)	171105	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cystinyl aminopeptidase 2. Insulin responsive aminopeptidase (IRAP) 3. Oxytocinase (OTASE) 4. Placental leucin aminopeptidase (P/LAP) 5. Leucyl-cystinyl aminopeptidase (LnPEP) 6. Vesicle protein 165 kDa (vp165) 7. Glykoprotein 160 kDa (gp160) 	Rattus norvegicus

Abbildung 1-10: Synonyme für die Insulin regulierte Aminopeptidase (IRAP)

IRAP wurde erstmalig in Vesikeln, die auch den Glukosetransporter GLUT4 enthalten, in Ratten-Adipozyten als Glykoprotein mit einem Gewicht von 165 kDa identifiziert (gp160) und teilweise sequenziert^[109].

Es existieren zahlreiche weitere Synonyme, die aus Abbildung 1-10 entnommen werden können. GLUT4 und IRAP zeigen identische subzelluläre Verteilungsmuster und reagieren auf einen Insulinstimulus mit der Translokation an die Zytoplasmamembran.

Tsujimoto et al. isolierten aus retroplazentalem Serum ein der IRAP-homologes humanes Protein mit identischen Eigenschaften, wie die Cystinyl-Aminopeptidase. Die Plazentale Leucyl-Aminopeptidase (P/LAP) hydrolysiert Oxytocin, Vasopressin und ANG III *in vitro* und könnte auf diesem Wege die Oxytocinkonzentration im Verlauf der Schwangerschaft kontrollieren^[110].

Die Klonierung von P/LAP cDNA zeigt die Zugehörigkeit zur Familie der Zink-abhängigen Metallopeptidasen. Northern Blot Analysen zeigen, dass P/LAP in vielen Geweben exprimiert wird. In einigen dieser Gewebe entstehen durch alternatives Splicing zwei mRNA Varianten des P/LAP-Genes. Dies eröffnet die Möglichkeit für die Expression gewebsspezifischer Subtypen^[111] des Enzyms.

Die Translation der mRNA führt zu einem Polypeptid aus 1025 AS, das in drei Abschnitte gegliedert werden kann. Die hydrophile N-terminale intrazelluläre Domäne, bestehend aus 110 AS, beinhaltet Regionen, die für die intrazelluläre Sortierung, Endozytose und Translokation von Bedeutung sind^[112]. Die intrazelluläre Domäne ist auch an zahlreichen Protein-Protein-Interaktionen beteiligt^[113-116]. Bereiche des zytoplasmatischen N-Terminus von IRAP und des C-Terminus von

GLUT4 interagieren mit intrazellulären Proteinen, welche für die Retention und Sortierung der Vesikel verantwortlich gemacht werden. Die Mikroinjektion des zytoplasmatischen N-Terminus von IRAP (AS 1-109) erhöht die GLUT4-Translokation in 3T3-L1 Adipozyten. Scheinbar konkurrieren GLUT4 und IRAP um Ankerproteine, so dass es zu einer Verdrängung von GLUT4 aus der Proteinbindung kommt^[117].

Eines dieser Enzyme wurde als Acyl-Coenzym A Dehydrogenase (ACD) indentifiziert, welches in den Mitochondrien an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt ist. ACD interagiert mit IRAP in GLUT4-Vesikeln über Dileucinbereiche des zytoplasmatischen Anteils des Proteins. Inhibitoren der ACD (3-Mercaptopropionsäure, Hexanoyl-CoA) führen zu einer Dissoziation des ACD / IRAP-Komplexes, was zu einer Erhöhung der GSV-Translokation führt und die Glukoseaufnahme in permeabilisierten 3T3-L1 Zellen erhöht^[113]. Weiterhin konnte Acyl-Coenzym A Synthetase-1 sowie lang- und mittelkettige Fettsäuren in GSV-Vesikeln nachgewiesen werden^[118]. Die lang- und mittelkettigen Fettsäuren sind als Bestandteil der GSV für die Regulation der endosomalen Transportvorgänge von großer Bedeutung. Hohe Triglyzeridspiegel und ein gesteigerter Fettsäureabbau führen zu einem Anstieg des Fettsäuregehalts in den GSV und zu einer Abnahme der Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme. Der Grund ist vermutlich eine gestörte Bildung und Translokation der GSV^[119].

Die Substanzgruppe der PPAR α -Agonisten^{viii} erhöht die Expression von Enzymen der β -Oxidation. Es konnte gezeigt werden, dass unter der Therapie mit PPAR α -Agonisten die Insulinsekretion der pankreatischen β -Zelle vermindert ist^[120]. Dieser als Lipotoxizität bekannte Prozess wird auch durch hohe Konzentrationen an freien Fettsäuren verursacht. Ein erhöhter Blutfettspiegel führt somit zu einer gestörten Translokation der GLUT4 / IRAP-Vesikel an die Plasmamembran von Adipozyten und Muskelzellen sowie zu einer verminderten Insulinsekretion der β -Zelle. Dies entspricht dem Erscheinungsbild eines Typ 2 Diabetes.

Dem 22 AS langen hydrophoben transmembranären Bereich des Enzyms, der das Enzym in der Zellmembran verankert, folgt der 893 AS große extrazelluläre Bereich. Der extrazelluläre Bereich beinhaltet die GAMEN-Domäne als katalytische Funktion des Enzyms sowie die HEXXH(X)₁₈E Zn²⁺ Bindungsdomäne, die IRAP als Mitglied der M1 Metalloproteasen charakterisiert (Abbildung 1-11).

^{viii} PPAR α = Peroxisom-Proliferations-aktivierter Rezeptor alpha

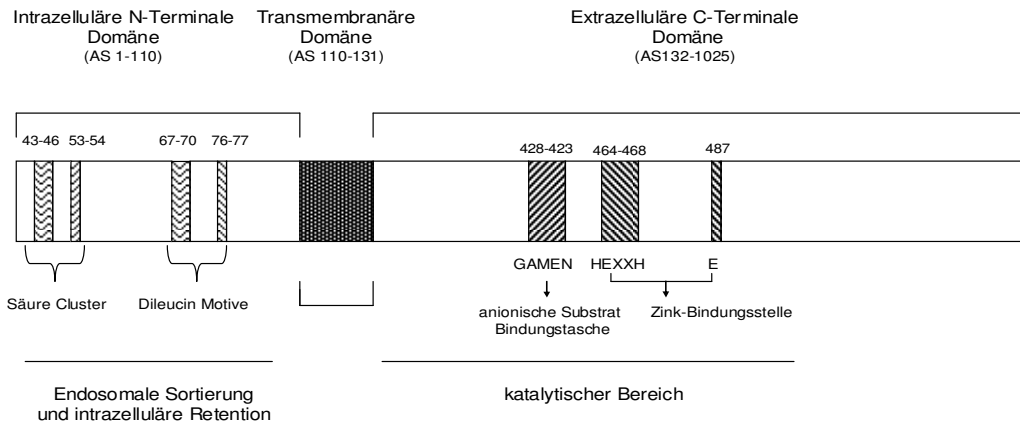


Abbildung 1-11 : Schematische Darstellung der IRAP-Struktur

1.5.1 IRAP als AT_4 -Rezeptor

Albiston et al.^[121] entdeckten, dass es sich bei IRAP und dem AT_4 -Rezeptor um identische Strukturen handelt. Substanzen, die an diesem Rezeptor binden, hemmen die katalytische Aktivität der Aminopeptidase, so dass man auch von IRAP-Inhibitoren sprechen kann. ANG IV interagiert mit einem juxtamembranär gelegenen extrazellulären Bereich des Peptids, der sich vom katalytischen Zentrum unterscheidet. Die Autoren vermuten, dass es durch eine allosterische Interaktion am Rezeptor zu einer Konformationsänderung des katalytischen Zentrums kommt und so die katalytische Aktivität abnimmt^[122]. In der Ratte wurden eine hochaffine (K_D : 2,7-5,7 nM) und eine niederaffine (K_D : 277-727 nM) ANG IV Bindungsstelle beschrieben^[123]. Dies könnte die Vermutung eines juxtamembranären AT_4 -Rezeptors untermauern, da ANG IV neben der Bindung am eigentlichen Rezeptor auch als Substrat des katalytischen Zentrums angesehen werden muss^[124] und so zwei Bindungsstellen verständlich wären. Homodimere des Rezeptors, die über eine Disulfidbindung verknüpft sind, konnten ebenfalls nachgewiesen werden^[125].

1.5.2 Vorkommen von IRAP

In insulinresistenten Geweben, wie Fettgewebe oder Skelettmuskel, findet man IRAP in Vesikeln, die auch den Glukosetransporter GLUT4 enthalten^[112]. In vielen anderen Geweben, die den GLUT4-Transporter nicht exprimieren, konnte IRAP ebenfalls identifiziert werden, wie z.B. im ZNS, in der Nebenniere, in der Milz, in der Prostata, in der Niere, im Thymus, im Herz, in der Aorta sowie in der Plazenta^[111, 112, 126, 127]. Das ubiquitäre Vorkommen des Enzyms lässt auf eine Vielzahl von physiologischen Funktionen schließen, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

1.5.2.1 IRAP im peripheren und zentralen Glukosestoffwechsel

In insulinresistenten Geweben, wie Muskel- und Fettgewebe, befindet sich IRAP gemeinsam mit dem Glukosetransporter GLUT4 in spezialisierten Speicher-vesikeln. Im Basalzustand (ohne Insulin-stimulus) der Zelle wird ein Großteil dieser Vesikel intrazellulär im Bereich der Trans Golgi-Region in der Nähe des Nukleus gespeichert. Insulin führt über

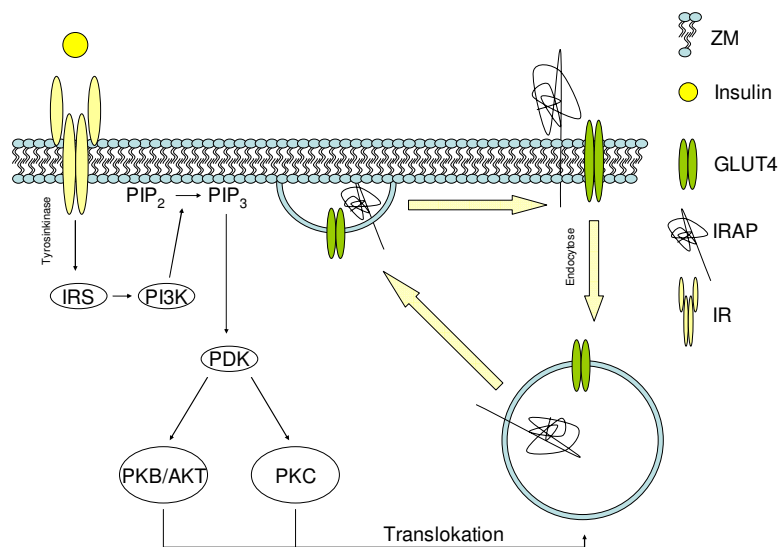


Abbildung 1-12: Schematische Darstellung der Insulin induzierten Translokation von IRAP- und GLUT4-haltigen Vesikeln an die Plasmamembran

Nach Phosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrats (IRS) kommt es zur Aktivierung der Kinasen PI3K, PIP₂, PDK und PKB bzw. PKC. Dies löst die Translokation der GSV aus. Zellmembran (ZM), Insulinrezeptor (IR)

Aktivierung der PI3K zu einer schnellen Translokation der GLUT4-Vesikel an die Plasmamembran. Nach Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran kommt es zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme in die Zelle. IRAP ist als Transmembranprotein in die Vesikelmembran der GLUT4-Vesikel integriert. Der hydrophile N-Terminus des Proteins ist in das Zytoplasma, der C-Terminus in Richtung des Lumens des Vesikels ausgerichtet. Nach Stimulation und Translokation fusioniert der Vesikel mit der Plasmamembran, wobei die katalytische Domäne des Enzyms im Extrazellularraum lokalisiert ist^[112] (Abbildung 1-12). Die physiologische Bedeutung der

insulinabhängigen Translokation von IRAP ist nicht bekannt und bedarf der Klärung. Eine mögliche Bedeutung könnte die Inaktivierung extrazellulärer Peptide sein. Diese Hypothese wird durch die Entdeckung unterstützt, dass Insulin die Hydrolyse von Vasopressin, einem IRAP Substrat, beschleunigt^[128].

IRAP knock-out Mäuse zeigen keine Auffälligkeiten bei der Betrachtung des basalen oder postprandialen Insulinspiegels, allerdings sinkt die basale und insulinabhängige Glukoseaufnahme in Adipozyten um 30-60 %. Die Gesamtzahl an GLUT4-Transportern sinkt in Muskel- und Fettzellen der IRAP (-/-) Mäuse um 40-85 % der ursprünglichen Anzahl^[129]. Nach Insulingabe weisen isolierte humane Adipozyten von Typ 2 Diabetikern, im Vergleich zu Adipozyten einer gesunden Kontrollgruppe, eine verminderte Translokation von IRAP an die Plasmamembran auf. Auch die insulinabhängige Glukoseaufnahme ist reduziert. Der Anteil membranständiger IRAP in Adipozyten von Typ 2 Diabetikern ist im Basalzustand, d.h. bei fehlendem Glukosestimulus, um den Faktor vier gegenüber den Kontrolladipozyten erhöht^[130]. Die Autoren schließen aus diesen Daten, dass die Insulinresistenz bei Typ 2 Diabetikern mit einer verminderten Rekrutierung von IRAP an die Plasmamembran einhergeht und daher die Spaltung endogener Substrate, wie z.B. Vasopressin, gestört ist. Dies hat eine verlängerte Wirkdauer dieser Substrate zur Folge, die für die Folgen des Typ 2 Diabetes mit verantwortlich sein könnten^[131]. Neben der Insulinresistenz und der Glukotoxizität, kommt es beim Typ 2 Diabetiker charakteristischerweise zu einer Hypertrophie des Herzens sowie eine verminderte Expression von GLUT4-Transportern. Ähnliches konnte auch in IRAP (-/-) Mäusen festgestellt werden^[131].

Auch in Neuronen des ZNS scheinen IRAP und GLUT4 in intrazellulären Kompartimenten kolokalisiert zu sein. Die Eigenschaft von ANG IV, die Gedächtnisleistung zu verbessern, könnte unter anderem mit einer erhöhten Glukoseaufnahme in diese Neuronen erklärt werden^[132].

1.5.2.2 Rolle von IRAP im Verlauf einer Schwangerschaft

IRAP wird in der Plazenta hauptsächlich in der apikalen Membran des Syntiotrophoblasten exprimiert. Reguliert wird die Transkription des IRAP-Gens durch die Transkriptionsfaktoren Ikaros und Aktivator Protein-2 (AP2), die im Trophoblasten nachgewiesen werden konnten^[133, 134]. Außerdem wird es Zyklus-abhängig vom Uterus gebildet. Die Plazenta bildet die membrangebundene

Form des Proteins, die dann ohne das N-terminale Ende ins Serum sezerniert wird. Diese lösliche Form des Proteins wird im Verlauf einer Schwangerschaft gebildet und ist bislang nur in der Plazenta beschrieben. Der IRAP-Serumspiegel steigt mit fortschreitender Schwangerschaft an. Maximalkonzentrationen des Proteins werden kurz vor den Wehen erreicht, um sich nach der Geburt wieder zu normalisieren^[127]. Das Neuropeptid Oxytocin wird, genau wie Vasopressin, im Hypothalamus gebildet und im Hypophysenhinterlappen gespeichert. Es löst über Oxytocinrezeptoren die Kontraktion der Uterusmuskulatur aus und wirkt so wehenauslösend. Oxytocin ist ein *in vitro*-Substrat von IRAP. Es ist denkbar, dass IRAP den Oxytocinspiegel im Verlauf einer Schwangerschaft kontrolliert und so bedeutsam für die Wehenregulation ist^[127]. Ein schwangerschaftsbedingter transienter Diabetes insipidus könnte durch den gesteigerten Umsatz des physiologischen IRAP-Substrats Vasopressin bedingt sein. Eine zu geringe IRAP-Aktivität während der Schwangerschaft wurde bei Patienten mit spontanen Frühgeburten oder Präeklampsie entdeckt^[135, 136]. Eine insulinabhängige hohe IRAP-Expression scheint außerdem die Prognose für Endometriumkarzinome zu verschlechtern^[137]. Die IRAP-Aktivität ist bei Ovarien- und Zervixtumoren verdoppelt und ist demnach ein Marker für bösartige gynäkologische Tumore^[138, 139]. Auch bei der Entstehung von Brustkrebs spielt IRAP eine Rolle^[140]. Cohen et al. konnten zeigen, dass IRAP-Inhibitoren die Implantation von primären Trophoblasten senken^[28].

1.5.3 IRAP-Substrate

Endogene Substrate der IRAP sind bislang nicht sicher identifiziert. Ursprünglich wurde IRAP als Markerprotein in GSV isoliert^[109]. Das gleiche Protein fand sich in der humanen Plazenta, hier als P/LAP (Placental Leucine Aminopeptidase)^[110]. *In vitro*-Substrate der IRAP sind Vasopressin^[141], Oxytocin, Somatostatin^[142], Cholecystokinin-8^[143], Met-/Leu-Enkephalin, Neurokinin A und B, Lys-Bradykinin und Dynorphin A. Aber auch ANG III und ANG IV werden zu einem gewissen Grad durch IRAP abgebaut^[124]. IRAP spaltet präferentiell N-terminale Cysteinreste und intramolekulare Disulfidbrücken^[124, 144], wie sie z.B. in Oxytocin und Vasopressin vorliegen. Vasopressin konnte nun als erstes physiologisches Substrat in IRAP (-/-) Mäusen nachgewiesen werden. Der Vasopressin-Plasmaspiegel in den knock-out Tieren erhöhte sich um den Faktor zwei, die Halbwertszeit des Peptids um den Faktor drei. Dieser IRAP-abhängige Effekt kann durch einen Insulinstimulus ausgelöst werden. Insulin modifiziert also die Vasopressinkonzentration im Plasma^[145].

1.5.4 IRAP-Inhibitoren / AT₄-Rezeptorliganden

1.5.4.1 Struktur-Wirkungsbeziehung

Wichtig für die Affinität von ANG IV zum AT₄-Rezeptor sind die N-terminalen AS Val-Tyr-Ile. Sardinia et al. vermuten, dass die geladene primäre α -Aminofunktion des Valins, der sperrige, aktivierte aromatische Ring des Tyrosins^[146] und eine freie räumliche Konformation des Valins die hohe Rezeptoraffinität bedingen. In Position 3 ist eine hydrophobe AS, wie Isoleucin, für eine hohe Rezeptoraffinität wichtig^[146]. ANG II ($K_i = 8,44 \times 10^{-7}$ M) und [D-Asp1]ANG III ($K_i = 8,44 \times 10^{-7}$ M) haben eine wesentlich geringere Affinität zum AT₄-Rezeptor. Bei den beiden bioaktiven Peptiden ist die räumliche Beweglichkeit des Valins durch die Amidfunktion deutlich eingeschränkt. Dies geht mit einem Verlust der Rezeptoraffinität einher. ANG III kann durch Austausch der N-terminalen AS L-Asp durch D-Asp vor enzymatischem Abbau durch die Aminopeptidase N geschützt werden. In Bindungsstudien kann so ausschließlich die Affinität von ANG III für den AT₄-Rezeptor bestimmt werden. Mischeffekte durch enzymatisch entstandenes ANG IV sind ausgeschlossen. Die AS 4 und 5 (His- Pro) wirken sich kaum auf die Rezeptoraffinität aus und dienen als Platzhalter. Die C-terminale AS Phenylalanin spielt keine so große Rolle für die Rezeptoraffinität wie das N-terminale Valin. Auch ANG 3-9 und 3-10 binden mit ähnlich hoher Affinität am Rezeptor (K_i : ANG 3-9 = $2,90 \times 10^{-9}$ M, K_i : ANG 3-10 = $1,96 \times 10^{-9}$ M). Werden C-terminal AS abgespalten, sinkt die Affinität (K_i : ANG 3-7 = $3,88 \times 10^{-9}$ M, K_i : = ANG 3-6 = $5,72 \times 10^{-8}$ M).

1.5.4.2 ANG IV

Das Hexapeptid Angiotensin IV ist ein bioaktiver Metabolit des Angiotensinabbaus mit der AS-Sequenz *Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe*. ANG IV entsteht aus dem Vorläuferprotein ANG III durch N-terminalen Abbau über die APN oder die Dipeptidylaminopeptidase (DAP)^[88]. Es wird schnell zu ANG 4-8 umgesetzt, welches ebenfalls Affinität zum AT₄-Rezeptor aufweist. Eine totale Inhibition des ANG IV-Abbaus wird erreicht, wenn die APN, die DAP sowie die NEP gehemmt werden.^[88] ANG IV selbst hemmt kompetitiv die Aminopeptidasefunktion von IRAP. Verschiedene pharmakologische Wirkungen werden für das Hexapeptid beschrieben, die auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen können:

- Die Inhibition der Aminopeptidasefunktion verlängert die Halbwertszeit endogener Substrate.
- Die Rezeptorstimulation führt zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege.
- Die Beeinflussung der zellulären Glukoseaufnahme fördert die Gedächtnisfunktion und das Zellwachstum.

Offen bleibt bislang, ob einer der genannten Mechanismen für die ANG IV-Wirkung von herausragender Bedeutung ist, oder ob IRAP bzw. der AT₄-Rezeptor neben der bekannten katalytischen Funktion auch direkt intrazelluläre Signale via eines second messenger-Wegs vermittelt.

1.5.4.3 Nle-ANG IV

Nle-ANG IV weist in Bindungsstudien an bovinen Nebennierenmembranen eine 1000 fach höhere Affinität zum AT₄-Rezeptor auf als ANG IV (K_i : Nle-ANG IV = $3,5 \times 10^{-12}$ M, K_i : ANG IV = $2,63 \times 10^{-9}$ M)^[147]. Lew et al. weisen eine 10 fach höhere Affinität des ANG IV-Analogen an Membranen von HEK293K Zellen nach, die mit dem humanen pCI-IRAP (AT₄-Rezeptor) transient transfiziert wurden. Im katalytischen Assay weist Nle-ANG IV hier jedoch, verglichen mit ANG IV, eine 3 fach geringere Affinität auf (K_i : ANG IV = 113 nM, K_i : Nle-ANG IV = 340 nM)^[124]. Die Steigerung der Affinität zum AT₄-Rezeptor konnte durch Einführung einer geradkettigen aliphatischen Butylgruppe in Form der AS Norleucin erreicht werden.

1.5.4.4 Divalinal

Divalinal bindet mit einer 20 fach geringeren Affinität als ANG IV am AT₄-Rezeptor. In Bindungsstudien an HEK293T-Zellmembranen^{ix} zeigte Divalinal eine K_i von 445 nM (ANG IV = 16,8 nM), im katalytischen Assay eine K_i von 2,3 μ M (ANG IV 113 nM)^[124]. Die Autoren vermuten, dass dieser Unterschied durch die Ab- bzw. Anwesenheit von Zinkionen in den jeweiligen Assays bedingt ist. Eine Degradation dieses nicht komplett peptidischen ANG IV-Analogs findet über den Zeitraum von zwei Stunden nicht statt^[148]. Divalinal ist ein ANG IV-Analogen, bei dem die AS Isoleucin durch Valin ausgetauscht und die Amidbindungen zwischen den AS Valin (an Position 1) und Tyrosin (an Position 2) sowie Valin (an Position 3) und Histidin (an Position 4) durch eine Methylengruppe ergänzt wurden. Divalinal hebt pharmakologische Effekte

^{ix} HEK = Human embryonic kidney

auf, die durch ANG IV ausgelöst werden und kann somit als AT₄-Rezeptorantagonist angesehen werden. Divalinal und ANG IV verursachen beide einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Handa et al. haben dies in humanen Epithelzellen des proximalen Tubulus sowie an bovinen Epithelzellen des distalen Tubulus nachweisen können^[149, 150]. In nanomolaren Konzentrationen erhöht sowohl Divalinal als auch ANG IV den intrazellulären Ca²⁺-Spiegel, in höheren Konzentrationen zeigt sich ein gegenteiliger Effekt. Diese biphasische Dosis-Wirkungsbeziehung könnte ein Hinweis dafür sein, dass Divalinal kein echter Antagonist ist, sondern aufgrund der eingesetzten hohen Konzentrationen in den biologischen Assays als AT₄-Rezeptoragonist wirkt oder als partieller Agonist angesehen werden muss.

1.5.4.5 LVV-Hemorphin-7

Das Dekapeptid LVV-Hemorphin-7 gehört, wie auch die Kasomorphine, zu den atypischen Opioiden. LVV-Hemorphin-7 wird aus der β-Kette des Hämoglobins gebildet und konnte aus dem Cortex von Schafen isoliert werden. Es verdrängt in Bindungsstudien ANG IV vom AT₄-Rezeptor, wobei die beiden Peptide eine ähnlich hohe Affinität aufweisen^[151]. Seine physiologischen Effekte entsprechen denen des ANG IV. LVV-Hemorphin-7 hemmt außerdem die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV)^[152]. DPP IV-Inhibitoren verlängern die Halbwertszeit der Inkretine GLP und GIP, die Glukose abhängig die Insulinsekretion steigern. Interessant zu erfahren wäre, ob im Umkehrschluss ANG IV ein Inhibitor oder Substrat der DPP IV ist.

1.5.5 ANG IV-Effekte

ANG IV weist eine Reihe von verschiedenen Effekten in unterschiedlichen Geweben auf. Einen Überblick über die nachgewiesenen Effekte zeigt die Abbildung 1-13 A und B. Die Rezeptorkopplung des AT₄-Rezeptors ist nicht endgültig geklärt. Die Literatur enthält sowohl Hinweise für G-Protein-gekoppelte AT₄-Rezeptoren als auch für Subtypen, die eine Tyrosinkinaseaktivität aufweisen.

Im isolierten proximalen Tubulus der Ratte wird durch ANG IV die Natriurese und die renale Durchblutung gesteigert^[153]. An Endothelzellen des proximalen Tubulus erhöht ANG IV den Natriumtransport^[154]. Diese Effekte sind zum einen G-Protein zum anderen Tyrosinkinase vermittelt.

Am Endothel der Hirnbasis Schlagader hat ANG IV in nanomolaren Konzentrationen einen vasokonstriktiven Effekt, der durch Divalinal und einen

Endothelinrezeptorantagonisten (PD142893) aufgehoben werden kann. Die Autoren sehen daher in ANG IV einen Mediator der endogenen Endothelinfreisetzung^[155]. Am Endothel der Lungenarterie führt ANG IV durch Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern zur NO-vermittelten Relaxation der Gefäßmuskulatur^[156-158].

Auf zellulärer Ebene aktiviert ANG IV den Transkriptionsfaktor NF κ B und fördert so die Transkription von proinflammatorischen Faktoren, wie PAI-1, TNF α , MCP-1, IL-6 und ICAM-1. Durch Protein-Tyrosinkinase-Hemmstoffe, wie Genistein, ließ sich die durch ANG IV ausgelöste NF κ B-Aktivierung aufheben. Neben ANG II spielt somit auch ANG IV durch Induktion proinflammatorischer Proteine eine Rolle bei der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen^[159].

Die Zellproliferation und die DNA-Synthese werden im ZNS^[160], im Herzmuskel^[161] und im Gefäßendothel^[162] durch ANG IV induziert.

1.5.5.1 Der AT₄-Rezeptor und ANG IV im ZNS

In einer Reihe von Verhaltensexperimenten konnte reproduzierbar gezeigt werden, dass ANG IV und andere AT₄-Rezeptorliganden bei intrazerebroventrikulärer Anwendung Gedächtnisbildung und Lernprozesse positiv beeinflussen^[163-171]. Die Stimulation zentraler AT₄-Rezeptoren führt zu einer Aktivierung cholinerg^[169, 171, 172], dopaminerger^[166, 173] Neurotransmittersystemen sowie zur Down-Regulation von Adenosin-1-Rezeptoren (A₁)^[174].

Ein endogener AT₄-Rezeptorligand mit Verbreitung im ZNS ist das Pseudoopioid LVV-Hemorphin-7. IRAP bzw. der AT₄-Rezeptor ist im humanen Gehirn in vielen Regionen nachgewiesen. Die Verteilung des Rezeptors im ZNS ist bei Mensch, Ratte, Meerschweinchen und Affe ähnlich. Der Rezeptor unterscheidet sich hier jedoch mit einem Molekulargewicht von 140 kDa von der IRAP, die in peripheren Geweben exprimiert wird^[112]. ANG IV-Bindungsstellen finden sich in hoher Dichte im zerebralen Cortex, im Hippocampus, im Putamen, in der Substantia nigra, in Bereichen des Thalamus sowie in hypothalamischen Bereichen^[175]. Diese Hirnregionen sind an Denk- und Gedächtnisprozessen beteiligt.

Neuropsychologische Studien an Ratten und Mäusen haben gezeigt, dass nach der intrazerebroventrikulären Injektion von ANG IV in pM-Dosen ein durch Scopolamin induzierter Gedächtnisschaden wieder aufgehoben werden kann^[169]. Die so verbesserte räumliche Orientierung konnte mit Divalinal, einem AT₄-Rezeptorantagonisten, wieder rückgängig gemacht werden^[170]. Lee et al.

zeigten, dass ANG IV die spannungsinduzierte Acetylcholinfreisetzung im Hippocampus und Neocortex, Bereiche, die reich an AT₄-Rezeptoren sind, steigert und auf diesem Weg Lernfähigkeit und Gedächtnis der Versuchstiere verbessert^[171]. Die Perfusion von Hippocampusschnitten mit Nle-ANG IV, einem stabilen ANG IV-Analogen, verstärkt NMDA-unabhängig die Langzeit-Potenzierung (LTP) neuronaler Synapsen durch einen erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Spiegel^[176]. Unter LTP versteht man eine lang andauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung. Glutamat aus der Präsynapse aktiviert AMPA-Rezeptoren; es kommt zum Na⁺-Influx und die Erregung wird postsynaptisch weitergeleitet. Bei synchronisierter Dauererregung der Postsynapse, so z.B. im Schlaf, werden zusätzlich NMDA-Rezeptoren aktiviert und es kommt zum Ca²⁺-Influx. Ca²⁺ aktiviert die PKC, und genomische Effekte führen zum vermehrten Einbau von Glutamatrezeptoren in die Postsynapse, die so sensibler auf Glutamat reagiert.

Neben der Dopamin- und Serotoninfreisetzung im Striatum und im Hippocampus^[173, 177] wird auch die zerebrale Durchblutung NO-vermittelt durch ANG IV gesteigert^[178, 179].

Diese Erkenntnisse machen stabile ANG IV-Analoga interessant für die Demenz- und Alzheimerforschung^[180].

Die IRAP-Substrate und Neuropeptide Vasopressin, Oxytocin und Cholezystokinin^[181, 182] haben ebenfalls eine positive Wirkung auf die Gedächtnisbildung und das Lernverhalten gezeigt. So konnte in Verhaltensstudien gezeigt werden, dass CCK-8- und CCK-B-Rezeptoragonisten die Gedächtnisbildung von Mäusen fördern^[183]. Vasopressin zeigte in Verhaltensstudien, dass es Gedächtnisbildung und Reproduktion von gelernten Inhalten fördert^[184]. Die Injektion von Oxytocin und Vasopressin in den Bulbus olfactorius verbessert das Wiedererkennen von Sozialpartnern^[185].

ANG IV und ANG IV-Analoga verlängern durch Inhibition der katalytischen Funktion von IRAP die Halbwertszeit dieser Neuropeptide im Gehirn und verbessern auf diesem Wege Lernprozesse und die Gedächtnisbildung.

1.5.5.2 ANG IV und PAI-1-Expression

Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) hemmt als Mitglied der Familie der Serinproteasen (Serpine) den gewebspezifischen Plasminogenaktivator (t-PA), der die Bildung von Plasmin aus Plasminogen katalysiert. Synthese und Sekretion des

Proteins finden in der Leber, dem Fettgewebe und den Endothelzellen statt^[186]. Eine erhöhte PAI-1-Expression wird charakteristischerweise bei adipösen Patienten beobachtet und geht mit einer Erhöhung des thromboembolischen Risikos einher^[187]. Neben $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und dem Transforming Growth Factor ($\text{TGF-}\beta 1$) stimulieren auch Angiotensin Peptide die PAI-1-Expression in humanen Adipozyten^[188]. ANG II induziert die PAI-1 mRNA-Expression in Adipozyten über den AT_1 -Rezeptor. Dieser Effekt kann durch Candesartan wieder aufgehoben werden. ANG III und ANG IV ($10\ \mu\text{M}$) sind ebenfalls in der Lage in humanen Adipozyten die PAI-1-Expression zu stimulieren. In Endothelzellen des proximalen Tubulus führen schon nanomolare ANG IV-Konzentrationen zu einer messbaren Steigerung der PAI-1-Sekretion^[186]. ANG II induziert auch in Endothelzellen eine Steigerung der PAI-1 mRNA-Expression; der Effekt konnte hier allerdings nicht mit AT_1 -Rezeptorantagonisten gehemmt werden. Amastatin, ein APN-Inhibitor, der den Abbau von ANG II zu ANG III und somit zu auch ANG IV hemmt, konnte die durch ANG II-induzierte PAI-1-Expression aufheben. Somit scheint in Endothelzellen hauptsächlich ANG IV über den AT_4 -Rezeptor die PAI-1-Expression zu stimulieren^[186]. Komponenten des RAS sind also in der Lage, über eine Stimulation der PAI-1 mRNA-Expression und nachfolgender Sekretion des gereiften Proteins in das Gerinnungsgeschehen einzugreifen. Ein aktiviertes RAS kann somit das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöhen.

Gewebe	ANG IV-Effekte					Literatur
	Effekt	Mediator	Mechanismus	ANG IV-Konz.	Testsystem	
Gefäße	AT ₄ -Rezeptor Upregulation Gefäß-Remodeling	-	Endothel- verletzung	-	Karotis	Moeller, 1999
	Atherogenese	NFκB↑ Zellproliferation ↑	AT ₄ -Rezeptor	-	-	Ruiz-Ortega, 2007
	Fibrinolyse ↓	PAI-1 ↑	AT ₄ -Rezeptor	10 nM	Gefäßendothel	Kerins, 1995
	Fibrinolyse ↓	PAI-1 ↑	AT ₄ -Rezeptor	1 μM	HCAEC ^x	Mahtel, 2002
	Inflammation ↑ Fibrinolyse ↓	NFκB, MCP-1, ICAM-1, TNFα, IL-6	AT ₄ -Rezeptor	100 nM	VSMC ^{xi}	Esteban, 2005
	Vasoprotektion	ROS ↓ eNOS ↑	AT ₄ - und / oder AT ₂ -Rezeptor	1,44 mg / Tag	ApoE -/- Maus ^{xii}	Vinh, 2008
	Vasorelaxation G-Protein, PI3K	Ca ²⁺ _{in.} ↑ eNOS↑ NO↑	AT ₄ -Rezeptor	1 μM	PAEC ^{xiii}	Chen, 2000
	Vasorelaxation	Calreticulin↑ Ca ²⁺ _{in.} ↑ eNOS↑	AT ₄ -Rezeptor	500 nM	PAEC	Patel, 1999
	Zellproliferation	PI3K, PDK-1, PKB, ERK 1/2	AT ₄ -Rezeptor	1 μM	PAEC	Li, 1998
Herz	Auswurf des linken Ventrikels ↓, beschleunigte Relaxation des Ventrikels	NO-unabhängig	AT ₄ -Rezeptor	10 nM	Isoliertes Kaninchenherz	Slinker, 1999
	c-fos↓, egr-1↓	-	AT ₄ -Rezeptor	10 nM	Isoliertes Kaninchenherz	Yang, 1997
	Proteinsynthese	-	-	100 nM	CRCF ^{xiv}	Wang, 1995
Fettgewebe	Fibrinolyse ↓	PAI-1↑	AT ₁ -Rezeptor	10 μM	Humane Adipozyten	Skurk, 2001
Uterus	Kontraktilität ↑	Oxytocin ↑	IRAP-Hemmung	1 μM	Glatte Gebärmuttermuskulatur (Ratte)	Gard, 2007

Abbildung 1-13 A: ANG IV-induzierte Effekte

^x HCAEC = Human coronary artery endothelial cells

^{xi} VSMC = Vascular smooth muscle cells

^{xii} APO = Apolipoprotein

^{xiii} PAEC = Porcine aortic endothelial cells

^{xiv} CRCF = Cultured rabbit cardiac fibroblasts

Gewebe	ANG IV-Effekte					Literatur
	Effekt	Mediator	Mechanismus	ANG IV-Konz.	Gewebe	
ZNS	Antikonvulsiv Dopaminfreisetzung ↑ GABA-Freisetzung ↓ Serotoninfreisetzung ↑	SST↑	IRAP-Hemmung	10 µM	Hippocampus (Ratte)	Stragier, 2006
	Antikonvulsiv	A ₁₁ -Rezeptor ↓	-	0,5 mg / kg	<i>in vivo</i> (Ratte)	Tchekarvalova, 2005
	Blutdruck↑	-	AT ₁ -Rezeptor	-	<i>in vivo</i> (Transgene Maus)	Lochard, 2004
	Cerebrale Durchblutung ↑	NO ↑	AT ₄ -Rezeptor	1 nM	<i>in vivo</i> (Ratte)	Faure, 2006
	Cerebrale Durchblutung ↑	-	AT ₄ -Rezeptor		<i>in vivo</i> (Ratte)	Krebs, 1996
	Cerebrale Durchblutung ↑	-	AT ₄ -Rezeptor	1 µg/(kg x min)	<i>in vivo</i> (Ratte)	Naveri, 1994
	DNA-Synthese	G-Protein unabhängig, (IRAP-Dimere) → TK		1 nM	SK-N-MC ^{xv}	Mustafa, 2001
	Dopaminfreisetzung ↑ Parkinsonprogression ↓	-	AT ₄ -Rezeptor	10 nM	Striatum (Ratte)	Stragier, 2007
	Erinnerungsvermögen ↑	-	AT ₄ -Rezeptor	1 nM	<i>in vivo</i> (Ratte)	Braszko, 1988
	Erinnerungsvermögen ↑	A(1)-Rezeptor ↓	-	0,1 µM / rat	<i>in vivo</i> (Ratte)	Tchekarvalova, 2001
	Erinnerungsvermögen ↑	-	-	1 nM	<i>in vivo</i> (Ratte)	Wright, 1993
	Gedächtnis (kein Effekt)	Oxytocin	IRAP-Hemmung	0,5 mg / kg KG	<i>in vivo</i> (BKW-Maus)	Gard, 2007
	Gedächtnisbildung ↑	Dopamin	-	0,05 mg / kg	<i>in vivo</i> (Ratte)	Braszko.2004
	LTP ↑	-	AT ₄ -Rezeptor	5 nM	Hippocampus (Ratte)	Wayner, 2001
	LTP ↑	-	AT ₄ -Rezeptor	1 µM	Hippocampus (Ratte)	Kramár, 2001
	LTP ↑	Ca ²⁺ _{ex} ↑	AT ₄ -Rezeptor	10 nM	Hippocampus (Ratte)	Davis, 2006
	LTP ↑	-	AT ₄ -Rezeptor	1 µM	Hippocampus (Ratte)	Wright, 2003
	LTP ↑	ACh↑	AT ₄ -Rezeptor	10 µM	Hippocampus (Ratte)	Lee, 2001
	Räumliche Orientierung ↑	ACh-Rezeptor	AT ₄ -Rezeptor	1 nM	Hippocampus (Ratte)	Pedersen, 201
	Räumliche Orientierung ↑	-	AT ₄ -Rezeptor	1 nM	<i>in vivo</i> (Ratte)	Lee, 2004
	TK-Aktivität ↑		„Non classic“ AT ₁ -Rezeptor	100 pM	Hypophysentumor-zelllinie	Rebas, 2004
	Vaskonstriktion	ET-1↑	AT ₄ -Rezeptor	100 nM	Isolierte Basilararterie (Maus)	Faure, 2006
	Vasorelaxation, Cerebrale Durchblutung	NO ↑	AT ₄ -Rezeptor	100 pM	<i>in vivo</i> (Ratte)	Kramár, 1998
Wiedererkennung ↑	Dopamin ↑	-	0,05 mg / kg	<i>in vivo</i> (Ratte)	Brazko, 2006	
Zellvitalität ↑	-	-	1 nM	AgKO Zellen (AGT-knock-out Mauszellen)	Kakinuma, 1997	
Niere	Fibrinolyse ↓	PAI-1↑	AT ₄ -Rezeptor	10 nM	HK-2 Zellen	Gesualdo, 1999
	G-Protein unabhängig	Ca ²⁺ _{in} ↑ _i		1 µM	MDBK ^{wt} Bovine Nierenepithelzellen	Handa, 1999
	G-Protein unabhängige Effekte ERK-2↑, p38 Kinase↑	MAP-Kinase ↑ Ca ²⁺ ↑ Na ⁺ ↑	AT ₄ -Rezeptor	10 nM	HK-2 Zellen Epithelzellen des proximalen Tubulus	Handa, 2001
	Natriumtransport↓	-	AT ₄ -Rezeptor	0,1 nM ANG 3-7	Isolierter proximaler Tubulus (Ratte)	Handa, 1999
	Natriurese ↑, renale Durchblutung ↑	-	AT ₄ -Rezeptor	100 pM / min	<i>in vivo</i> (Ratte)	Hamilton, 2001
	Öffnung spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Kanäle, PI3K unabhängig	Ca ²⁺ _{ex} ↑ G-Protein	AT ₄ -Rezeptor	10 nM	OK7A, Nierenzellen vom Opossum	Dulin, 1995
	P125-focal adhesions Kinas ↑, p-68 Paxillin ↑	TK-Aktivität ↑	AT ₄ -Rezeptor	1 µM	LLC-PK ₁ /Cl ₂ Zellen, proximale Tubuluszelllinie vom Schwein	Chen, 2001

Abbildung 1-13 B: ANG IV-induzierte Effekte

^{xv} SK-N-MC = Humane Neuroblastom Zelllinie

1.6 Zielsetzung

Einige Bestandteile eines lokalen RAS des endokrinen Pankreas wurden bereits identifiziert, und die Modulation der β -Zellfunktion durch Aktivierung des AT_1 -Rezeptors ANG II-abhängig untersucht. Weitere intrinsisch aktive ANG II-Abbauprodukte, wie ANG III, ANG IV oder ANG 1-7, die an den gezeigten ANG II-Wirkungen beteiligt sein könnten, bleiben als mögliche Effektorpeptide unberücksichtigt. Unklar ist die Existenz und die physiologische Funktion weiterer Rezeptoren des RAS im endokrinen Pankreas und speziell in der β -Zelle.

Der AT_4 -Rezeptor / IRAP ist als hochaffine Bindungsstelle für AT_4 -Rezeptoragonisten in vielen Geweben beschrieben. Die Aktivierung des Rezeptors durch ANG IV löst pleiotrope Wirkungen aus; unter anderem kommt es zur Beeinflussung des Glukosestoffwechsels.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Fragestellungen bearbeitet werden.

- Nachweis und Lokalisation des AT_4 -Rezeptors / IRAP in der β -Zelle durch Western Blot und konfokale Laserscanning Mikroskopie.
- Pharmakologische Charakterisierung des AT_4 -Rezeptors der β -Zelle durch AT_4 -Rezeptoragonisten und -antagonisten in Ca^{2+} -Aufnahme- und Insulinsekretionsversuchen sowie Plasminogen-Aktiviator-Inhibitor-1 (PAI-1)-Expressionsstudien.

(PAI-1 gehört zu den Serin-Proteaseinhibitoren. Die Hauptfunktion besteht in der Hemmung des gewebsspezifischen Plasminogen-Aktivators (t-PA). Eine erhöhte PAI-1-Aktivität im Plasma ist mit einer verminderten fibrinolytischen Aktivität assoziiert.)

- Untersuchung der Aminopeptidasefunktion von IRAP durch Angiotensin Peptide und IRAP-Substrate in einem Enzym-Assay.
- Einfluß von ANG IV auf den Glukosestoffwechsel *in vivo*.
- Turnover des RAS im endokrinen Pankreas und der β -Zelle mittels HPLC-MS-Metabolisierungsstudien.

2 Material

2.1 Zelllinien

Die Kultur der permanenten Zelllinien 3T3-L1 und INS-1 erfolgt im Zellkulturschrank bei 37°C in einer Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO₂ in 75 cm² Zellkulturflaschen. Alle Zelllinien werden in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert. Zellen in Kultur werden ab Passagenummer 50 bei den 3T3-L1 Fibroblasten und 70 bei den INS-1 Zellen verworfen und aus tiefgefrorenen Stocks (in Flüssigstickstoff gelagert) frisch kultiviert, da sich die Zellkultur nach langer Passagezeit im Proteinexpressionsmuster verändern kann. So wird eine konstante Zellqualität gewährleistet.

2.1.1 INS-1 Zellen

Asfari et al. etablierten 1992 eine durch Röntgenstrahlen-induzierte permanente Ratteninsulinoma Zelllinie^[189]. Durch die Zugabe von Mercaptoethanol wird der Glutathionspiegel in der Zelle erhöht und somit das Wachstum der Zelle gewährleistet. Sie weist ähnliche Charakteristika auf wie native β-Zellen und reagiert auf einen Glukosestimulus von 2,8-20 mM mit einer Insulinsekretion. Diese Insulinsekretion entspricht in etwa 20 % der nativen Insulinsekretion der β-Zelle. Modulatoren der Insulinsekretion können deshalb an dieser Zelllinie erfolgreich untersucht werden. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgt nach etablierten Methoden^[190]. Nach Zellaussaat sind die Zellen nach fünftägiger Kultivierung für die Versuche einsetzbar.

2.1.2 3T3-L1 Zellen

Die 3T3-L1 Zelllinie ist ein Subklon der murinen Fibroblasten Zelllinie 3T3 und wurde 1974 durch Green und Meuth etabliert^[191]. Die hier verwendete Zelllinie stammt von der Firma ECACC. Aus der 3T3-Zelllinie gingen verschiedene pluripotente Subklone hervor, wie die 3T3-F442A oder NIH-3T3, die für spezielle Fragestellungen als Zellkulturmodell dienen.

2.2 Zellkultur

Chemikalien	Hersteller
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
DMEM high Glukose (4,5 g / l)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Dulbecco´s PBS Lösung	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Foetales Bovines Serum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Geneticin	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
HEPES Pufferlösung 1M	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
IBMX	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
Rinderinsulin für die Zellkultur	Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA
L-Glutamin-Lösung 200 mM	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Mercaptoethanol	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Neonatales Kälberserum (NCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin 100 x	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Pyruvat-Na Lösung 100 mM	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
RPMI 1640	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Materialien	Hersteller
Kryobehälter	Tylor-Wharton, Theodor, AL
Kryogefäße 1,5 ml	Nalgene, Rochester, New York, USA
Kühlzentrifuge CR412	Jouan GmbH, Frankfurt
Laminar Air Flow Werkbank Antair BSK	Anthos, Siegburg
Lichtmikroskop	Krüss GmbH, Hamburg
Multiwell Platten 6, 24, 96	Nunc, Wiesbaden
Pipetboy	Abimed, Langenfeld
Proben-Einfriercontainer	NationalLab, Mölln
Probenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter PTFE	Millipore, Billerica, MA, USA
Sterilfilter PVDF	Millipore, Billerica, MA, USA
Wasserbad	Julab, Seelbach
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturschrank HeraCell 240	Kendro-Heraeus, Berlin
Zellkulturschrank IG 15	Jouan GmbH, Frankfurt

Zusätze für die Zellkulturmedien

	Herstellung
Dexamethasonstammlösung	9,8 mg werden in 1 ml Ethanol gelöst mit sterilfiltriertem ddH ₂ O auf 5 ml aufgefüllt, aliquotiert und bei -20°C gelagert
Rinderinsulin 10 mg / ml	Stammlösung wird direkt verwendet (1/ 10000)
IBMX 10	55 mg IBMX werden in 250 µl DMSO gelöst und zu dem Medium gegeben
Geneticin 200 µg / ml	110 mg Geneticin (G418) werden in sterilfiltriertem ddH ₂ O gelöst und zum Medium gegeben

Zellkulturmedien für 3T3-L1 Zellen

Medium	Zusätze	Endkonzentration
Fibroblastenkulturmedium	DMEM high Glukose	
	NCS	10 %
	Glutamin	2 mM
	Penicillin	100 I.U. / ml
	Streptomycin	100 µg / ml
	HEPES	10 mM
	Pyruvat	1 mM
Adipozytenkulturmedium	DMEM high Glukose	
	FCS	10 %
	Glutamin	2 mM
	Penicillin	100 I.U. / ml
	Streptomycin	100 µg / ml
	HEPES	10 mM
	Pyruvat	1 mM
Fibroblastendifferenzierungsmedium	Adipozytenkulturmedium	
	IBMX	0,5 mM
	Dexamethason	0,25 µM
	Insulin	1 µg / ml
	Lichtgeschützt 3 Wochen haltbar	
Adipozytendifferenzierungsmedium	Adipozytenkulturmedium	
	Insulin	1 µg / ml

Zusätze für INS-1 Medien

Medium	Zusätze	Endkonzentration
Kulturmedium	RPMI	
	FCS	10 %
	Glutamin	2 mM
	Penicillin	100 I.U / ml
	Streptomycin	100 µg / ml
	HEPES	10 mM
	Na-Pyruvat	1 mM
	Mercaptoethanol	40 µM
Selektionsmedium	Kulturmedium	
	Geneticin	200 µg / ml

2.3 Sonstige Chemikalien

Substanz	Hersteller
(Nle)-ANG IV (3-8)	PhoenixPeptide, Burlingame, CA, USA
(Sar1,II108)-Angiotensin II	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
Angiotensin I	Bachem, Weil am Rhein
Angiotensin I/II (3-8)	Bachem, Weil am Rhein
Angiotensin I/II (4-8)	Bachem, Weil am Rhein
Angiotensin II acetat salt	Bachem, Weil am Rhein
Angiotensin III	Bachem, Weil am Rhein
Angiotensinogen	Bachem, Weil am Rhein
Bafilomycin A ₁	LC Laboratories, Woburn, MA
Rinder Serum Albumin	Haus intern
Divalinal Angiotensin IV	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
EDTA-Dinatriumsalz Lösung	Waldeck, Münster
Interleukin-1 β	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
Oxytocin (Syntocinon [®])	Novartis Pharma, Nürnberg
Pankreatisches Polypeptid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
Glibenclamid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
Nifedipin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri

2.4 Gentechnische Arbeiten

Geräte	Hersteller
BioDocAnalyzer	Biometra, Göttingen
Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Gefäße für den Hybridisierungssofen	Biometra, Göttingen
Hybridisierungssofen OV1	Biometra, Göttingen
IKAMAG [®] RCT	IKA Werke, Staufen i. Br.
Uno-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Elektrophorese-Kammer	MWG Biotec, Ebersberg
GeneAmp [®] 5700	Applied Biosystems, Lincoln, CA
Spannungsquelle Model 200/2.0	BIO-RAD, Hercules, California

Chemikalien	Hersteller
100 Bp DNA-Leiter	Diagonal, Münster
Agarose	ICN Biomedicals, Eschwege
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
Biosphere [®] Filter Tips	Eppendorf, Hamburg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
DH5α E.Coli	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
Fugene6	Roche Diagnostics, Mannheim
Glycerol 85 %	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen, Germantown, MD
LB-Agar	BIO-RAD, Hercules, California
LB-Broth	BIO-RAD, Hercules, California
MicroAmp [™] Optical 96-Well	Applied Biosystems, Lincoln, CA
Petrischalen 92x16 mm	Sarstedt, Nürnbrecht
QuantiTect [®] Primer Assay RRN18S	Qiagen, Germantown, MD
QuantiTect [®] Primer Assay Serpine1	Qiagen, Germantown, MD
QuantiTect [®] Reverse Transcription Kit	Qiagen, Germantown, MD
QuantiTect [®] SYBR Green Kit	Qiagen, Germantown, MD
Rneasy [®] Mini Kit	Qiagen, Germantown, MD
SOC-Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.4.1 Plasmide

Das Plasmid IRAP-GFP bestehend aus IRAP, welches am C-Terminus mit GFP gekoppelt wurde, ist ein Geschenk von J.M. Taveré, School of Medical Science, University of Bristol, UK^[192]. Die Arbeitsgruppe generierte das Plasmid aus einem partiellen IRAP cDNA Klon, den sie freundlicherweise von S.R. Keller (Dartmouth Medical School, Hanover, USA) erhielten. Das IRAP Fragment

(Basen 66-533) wurde per PCR erstellt. Dabei kamen folgende Primer zum Einsatz 5' -TTTTAAGCTTGCGAAGATGGAGACC- 3' und 5' -TTTTGGATCCAATCGGCTGAATGAG- 3'. Das PCR-Produkt wurde in die Schnittstelle der Restriktionsenzyme HindIII and BamHI des Expressionvektors pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, USA) cloniert. GFP wurde mittels PCR und den Primern 5' -TTTTGGATCCAGTAAAGGAGAAGAAGAA-3' und 5' -TTTTCTCGAGTTACCTCAGGTCCTCCTCCGAGATCAGCTTCTGCATTTTGTATAGTTCATC-3' amplifiziert und an das 3' Ende von IRAP in das bestehende IRAP-pcDNA3 Plasmid subkloniert (BamHI und XhoI Schnittstelle). Das Plasmid codiert nun für ein IRAP-Protein bei dem der extrazelluläre Anteil durch das GFP ersetzt wurde, der zytoplasmatische Anteil jedoch intakt ist.

Das GFP-pcDNA Plasmid wurde von der Arbeitsgruppe Klempnauer (Institut für Biochemie der Universität Münster) zur Verfügung gestellt.

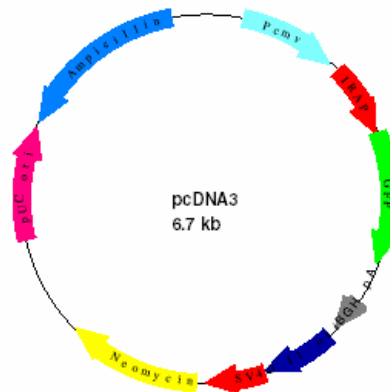


Abbildung 2-1: IRAP-GFP Plasmid

Lösungen und Puffer

Die für die Elektrophorese, Transformation und Transfektion notwendigen Lösungen werden mit Aqua bidest. hergestellt und bei 4 °C gelagert.

- Ampicillin-haltige LB-Agar Platten

Der LB-Agar wird in einer Konzentration von 35 g / L mit ddH₂O angesetzt und dann autoklaviert. Nach dem Abkühlen werden dem noch warmen Agar 100 µg / ml Ampicillin, gelöst in autoklaviertem ddH₂O und sterilfiltriert, zugegeben. Der Agar wird

unter der Laminar Air Flow Bank in sterile Petrischalen überführt. Die Platten werden luftdicht mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C gelagert.

- Ampicillin-haltiges LB-Medium

Das LB-Medium wird in einer Konzentration von 20 g / L mit ddH₂O angesetzt und dann autoklaviert. Ampicillin wird analog dem LB-Agar hinzugefügt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

- TBE-Puffer (pH 8)

Substanz	Menge
Tris	10,7 g
Borsäure	5,5 g
EDTA	7,44 g

- Probenpuffer

Vor der Elektrophorese werden die DNA Proben mit Probenpuffer und ddH₂O verdünnt. In der Regel werden 2 µl Probe mit 13 µl ddH₂O und 5 µl Probenpuffer verdünnt und in die Geltasche eingetragen.

Substanz	Anteil
Bromphenolblau	0,001 %
Glycerol	30 %
ddH ₂ O	69,99 %

- Agarosegel

Agarosegele für die Elektrophorese werden je nach Größe der zu trennenden DNA Fragmente angefertigt. Verwendet werden 2,0 und 0,5 % ige Agarosegele. Die Agarose wurde in TBE-Puffer aufgekocht, gelöst und dann mit 20 µl einer 0,1 µg / ml Ethidiumbromidlösung versetzt.

2.5 Western Blot

Geräte	Hersteller
Celloshaker Variospeed	Neolab, Heidelberg
Digital pH-Meter 646	Knick, Berlin
Elektrophoresekammer	Eigenherstellung
Filtermembran	Schleicher & Schüll, Dassel
L8-70M Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll, Dassel
Soniprep 150	Sanyo Gallenkamp PLC, Loughborough, UK
Trans Blot Transfer Zelle	BIO-RAD, München
Vortex Genie 2™	Bender und Hobein, Zürich, CH
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences, Freiburg

Chemikalien, Antikörper	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid	BIO-RAD, Hercules, California
Anti-Rabbit IgG	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
Anti-Rabbit IgG Peroxidase Konjugat	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
APS	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
DTT	Fluka, Steinheim
HRP Chemilumineszenz	Millipore, Schwalbach
Magermilchpulver	Fluka, Steinheim
Multigrade Papierentwickler	Iford, Mobberley Ceshire, UK
Polyklonal IRAP- Antikörper	Department of Internal Medicine, Division of
Prestained SDS-Page Standards	Endocrinology, S.R. Keller, Charlottesville
Proteaseinhibitorcocktail	Roche, Mannheim
SDS	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
TEMED	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
Tris	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri
Anti GLUT4 IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA

Lösungen und Puffer

<ul style="list-style-type: none"> Anodenpuffer (pH 8,4) 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Substanz</th> <th>Konzentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tris</td> <td>25 mM</td> </tr> <tr> <td>ddH₂O</td> <td>ad 1000 ml</td> </tr> </tbody> </table>	Substanz	Konzentration	Tris	25 mM	ddH ₂ O	ad 1000 ml								
Substanz	Konzentration														
Tris	25 mM														
ddH ₂ O	ad 1000 ml														
<ul style="list-style-type: none"> Kathodenpuffer 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Substanz</th> <th>Konzentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tris</td> <td>350 mM</td> </tr> <tr> <td>Glycin</td> <td>1,92 mM</td> </tr> <tr> <td>SDS</td> <td>0,1 %</td> </tr> <tr> <td>NaN₃</td> <td>0,1 %</td> </tr> <tr> <td>ddH₂O</td> <td>ad 500 ml</td> </tr> </tbody> </table>	Substanz	Konzentration	Tris	350 mM	Glycin	1,92 mM	SDS	0,1 %	NaN ₃	0,1 %	ddH ₂ O	ad 500 ml		
Substanz	Konzentration														
Tris	350 mM														
Glycin	1,92 mM														
SDS	0,1 %														
NaN ₃	0,1 %														
ddH ₂ O	ad 500 ml														
<ul style="list-style-type: none"> Trenngelpuffer 3 x <p>Acrylamid 40 %, APS 10 %, TEMED und ddH₂O dienen zur Herstellung eines 7,5 % Polyacrylamidgeles.</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Substanz</th> <th>Menge</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tris</td> <td>13,6 g</td> </tr> <tr> <td>SDS</td> <td>0,3 g</td> </tr> <tr> <td>ddH₂O</td> <td>ad 50 ml</td> </tr> </tbody> </table>	Substanz	Menge	Tris	13,6 g	SDS	0,3 g	ddH ₂ O	ad 50 ml						
Substanz	Menge														
Tris	13,6 g														
SDS	0,3 g														
ddH ₂ O	ad 50 ml														
<ul style="list-style-type: none"> Sammelgelpuffer 2 x <p>Das Sammelgel hat eine Polyacrylamidkonzentration von 4 %.</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Substanz</th> <th>Menge</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tris</td> <td>3,5 g</td> </tr> <tr> <td>SDS</td> <td>0,2 g</td> </tr> <tr> <td>ddH₂O</td> <td>ad 50 ml</td> </tr> </tbody> </table>	Substanz	Menge	Tris	3,5 g	SDS	0,2 g	ddH ₂ O	ad 50 ml						
Substanz	Menge														
Tris	3,5 g														
SDS	0,2 g														
ddH ₂ O	ad 50 ml														
<ul style="list-style-type: none"> Probenpuffer 2 x (pH 6,8) <p>Der fertige Probenpuffer wird in situ mit DTT (1M 0,96 ml ddH₂O + 20 µl DTT) versetzt.</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Substanz</th> <th>Menge</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tris</td> <td>3 g</td> </tr> <tr> <td>Glycerol 85 %</td> <td>20 g</td> </tr> <tr> <td>EDTA</td> <td>2 ml</td> </tr> <tr> <td>SDS</td> <td>4 g</td> </tr> <tr> <td>Bromphenolblau</td> <td>20 mg</td> </tr> <tr> <td>ddH₂O</td> <td>ad 100 ml</td> </tr> </tbody> </table>	Substanz	Menge	Tris	3 g	Glycerol 85 %	20 g	EDTA	2 ml	SDS	4 g	Bromphenolblau	20 mg	ddH ₂ O	ad 100 ml
Substanz	Menge														
Tris	3 g														
Glycerol 85 %	20 g														
EDTA	2 ml														
SDS	4 g														
Bromphenolblau	20 mg														
ddH ₂ O	ad 100 ml														
<ul style="list-style-type: none"> PBS-Puffer (pH 7,4) <p>Magermilchpulver wird nach Bedarf zum blockieren und waschen der Nitrocellulosemembran in PBS-Puffer suspendiert.</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Substanz</th> <th>Menge</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NaCl</td> <td>8,0 g</td> </tr> <tr> <td>KCl</td> <td>0,26 g</td> </tr> <tr> <td>Na₂HPO₄</td> <td>1,42 g</td> </tr> <tr> <td>KH₂PO₄</td> <td>0,27 g</td> </tr> <tr> <td>ddH₂O</td> <td>ad 1000 ml</td> </tr> </tbody> </table>	Substanz	Menge	NaCl	8,0 g	KCl	0,26 g	Na ₂ HPO ₄	1,42 g	KH ₂ PO ₄	0,27 g	ddH ₂ O	ad 1000 ml		
Substanz	Menge														
NaCl	8,0 g														
KCl	0,26 g														
Na ₂ HPO ₄	1,42 g														
KH ₂ PO ₄	0,27 g														
ddH ₂ O	ad 1000 ml														
<ul style="list-style-type: none"> Blotting-Puffer 	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Substanz</th> <th>Menge</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tris</td> <td>5,8 g</td> </tr> <tr> <td>Glycin</td> <td>2,9 g</td> </tr> <tr> <td>SDS</td> <td>0,0375 g</td> </tr> <tr> <td>Methanol</td> <td>200 ml</td> </tr> <tr> <td>ddH₂O</td> <td>ad 1000 ml</td> </tr> </tbody> </table>	Substanz	Menge	Tris	5,8 g	Glycin	2,9 g	SDS	0,0375 g	Methanol	200 ml	ddH ₂ O	ad 1000 ml		
Substanz	Menge														
Tris	5,8 g														
Glycin	2,9 g														
SDS	0,0375 g														
Methanol	200 ml														
ddH ₂ O	ad 1000 ml														
<ul style="list-style-type: none"> Lyse-Puffer <p>Zusätzlich 1 Tablette Millipore Proteaseinhibitor Mix in 10 ml Puffer</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Substanz</th> <th>Konzentration</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Tris</td> <td>50 mM</td> </tr> <tr> <td>EDTA</td> <td>150 mM</td> </tr> <tr> <td>NaCl</td> <td>3 mM</td> </tr> <tr> <td>PMSF</td> <td>1 mM</td> </tr> </tbody> </table>	Substanz	Konzentration	Tris	50 mM	EDTA	150 mM	NaCl	3 mM	PMSF	1 mM				
Substanz	Konzentration														
Tris	50 mM														
EDTA	150 mM														
NaCl	3 mM														
PMSF	1 mM														

2.6 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Geräte	Hersteller
μ-Slides VI Flow	Ibidi, Martinsried
Lab Tek Chamber Slides	Nunc, Wiesbaden
True Confocal Scanner Leica TCS SP11	Leica, Wetzlar

Chemikalien	Hersteller
Aqua PolyMount	Polysciences Inc., Warrington, PA

2.7 Radioaktive Bestimmungen

Geräte	Hersteller
Betacounter LS 6000	Beckmann, Habour ,CA
Gammacounter LB 2111	Berthold, Wildbad
Szintillationsröhrchen 5 ml	Zinser Analytik, Frankfurt
Röhren 4,5 ml	Sarstedt, Nürnberg

Chemikalien	Hersteller
Liquid Scintillator Unisafe 1	Zinser Analytic, Frankfurt
⁴⁵ Calcium	Amersham, Pscataway, NJ
¹²⁵ I-Insulin vom Schwein	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Anti-Meerschweinchen IgG (Ziege)	Linco Research INC.St. Luis, USA
Anti-Meerschweinchen Carrier IgG	Linco Research INC.St. Luis, USA
Anti-Ratteninsulin IgG	Biotrend, Köln
Insulinstandard	Novo Nordisk, Bagsvaerds, DK

Lösungen und Puffer

- KRH-Puffer

Zusammensetzung siehe IRAP-Assay, wird für Insulinsekretionsversuche als auch für ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahmeversuche verwendet.

- Assay-Puffer (pH 7,4)

Substanz	Konzentration
NaCl	154 mM
NaH ₂ PO ₄ x 12 H ₂ O	46 mM
KH ₂ PO ₄	4,8 mM
EDTA	37 mM
Thiomersal	0,01 %

- Isotopenpuffer (pH 7,4)

KRH-Puffer wird mit 0,1 % Natriumazid und 1 % BSA versetzt.

- Stammlösungen
- ¹²⁵I-Insulin wird in Isotopenpuffer verdünnt und aliquotiert. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C.
- Anti Ratten-Insulin IgG wird in Assay-Puffer (+1 % BSA) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

- Anti Meerschweinchen Carrier IgG wird in 6 ml Assay-Puffer aufgenommen, aliquotiert und eingefroren.
- Ratteninsulinstandard (20 mU / 20 µl) wird in 10 ml Assay-Puffer (+1 % BSA) gelöst. Aus dieser Stammlösung wird eine Insulin-Verdünnungsreihe erstellt.

2.8 IRAP-Assay

Geräte	Hersteller
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzreader Fluostar®	BMG Labtech, Offenburg
Multiwell-Platte 96er, schwarz, Spitzboden	Nunc, Wiesbaden

Substanzen	Hersteller
β-Amino-Naphthalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Leucin-2-Naphthylamid	Fluka, Buchs, CH

Puffer und Stammlösungen

- Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRH) (pH 7,35)

Der Krebs-Ringer-HEPES ist eine Weiterentwicklung des Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffers. Durch den Austausch von Bicarbonat gegen HEPES ist die Stabilisierung des pH-Werts verbessert worden.

Substanz	Konzentration
NaCl	118,40 mmol/l
KCl	4,84 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,19 mmol/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,19 mmol/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,54 mmol/l
HEPES	10,00 mmol/l

- NA-Stammlösung (10 µM)

14,3 mg 2-Amino-Naphthalin werden in 10 ml EtOH gelöst (10 mM). 50 µl werden von dieser Lösung entnommen und mit KRH-Puffer auf 50 ml aufgefüllt (10 µM). Aus der Stammlösung werden die Verdünnungen für die Kalibriergerade hergestellt.

- Leu-NA-Stammlösung (5 mM)

14,6 mg Leucyl-Naphthylamid werden in 10 ml dest. H₂O gelöst.

- Leu-NA-Lösung (100 µM)

200 µl der Leu-NA-Stammlösung werden mit KRH-Puffer auf 10 ml verdünnt. So ergibt sich eine Endkonzentration von 25 µM im Well.

Zellsuspension

Der Inhalt einer Zellkulturflasche wird 3 x mit KRH-Puffer gewaschen und mittels Zellschaber in 15 ml KRH-Puffer aufgenommen und resuspendiert. 50 µl dieser Suspension kommt pro Well im Assay zum Einsatz.

2.9 HPLC-MS

Geräte, Material	Hersteller
ACE3C18 100 x 2,1 mm, 3 µM	HiChrom, UK
LCQ [®] ion trap mass spectrometer	Thermo-Finnigan, San Jose, CA
Glass Vial 1,5 ml	Supelco, Bellfonte ;PA
Glass Insert Shell 0,35 ml	Supelco, Bellfonte, PA
Phenomenex Synergie 75 x 2 mm 4 µM	Phenomenex, Aschaffenburg
Waters 2690 Separations module	Waters, Milford, MA
Waters 2487 Detektor	Waters, Milford, MA
Xcalibur Software	Spectronex, Schweiz

Chemikalien	Hersteller
Acetonitril p.A.	VWR International, Darmstadt
ddH ₂ O p.A:	VWR International, Darmstadt
Ameisensäure p.A.	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniumformiat ultra	Fluka, Buchs, Schweiz

3 Tiere

Die Versuche zur Bestimmung von Plasmainsulin- und Blutglukosespiegel wurden an weiblichen und männlichen Ratten durchgeführt. Es handelt sich dabei um einen Stamm von Albino-Ratten, der 1960 im Wistar-Institut in Philadelphia, USA, gezüchtet wurde. Die hier verwendeten Tiere stammen von den Charles River Laboratories, 97633 Sulzfeld, Deutschland.

Die Haltung der Tiere erfolgte in einem klimatisierten Stall bei einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22°C und konstanter Luftfeuchtigkeit mit einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden in Makrolonkäfigen. Im Makrolonkäfig haben die Tieren freien Zugang zu Leitungswasser und standardisiertem Futter (Altromin® 1234, Fa. Altromin, Lage).

Zum Versuchszeitpunkt hatten die Versuchstiere ein Gewicht von 180-280 g. Alle durchgeführten Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Münster genehmigt und gemäß den geltenden Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Für die Präparationen wurde ein OP-Besteck der Firma Hammacher verwendet. Für die weiteren Arbeitsschritte kamen Sterican® Kanülen (0,45 x 12 mm) und Omnifix-F1 (1 ml Fertigspritzen) von der Firma Braun (Melsungen) zum Einsatz.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Zur Passagierung der INS-1 Zellen und der 3T3-L1 Fibroblasten wird das Medium verworfen und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung einige Minuten angedaut und können dann vom Boden der Zellkulturflasche abgeschlagen werden. Die Zellsuspension wird bei 300 x g zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl der INS-1 Zellen wird mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ermittelt und in einer Menge von 5×10^6 Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen, 6 oder 24er Multiwellplatten, oder Chamberslides für die Konfokalmikroskopie ausgesät. Die Differenzierung der 3T3-L1 Fibroblasten in Adipozyten erfolgt über einen Zeitraum von 20 Tagen nach der von Weiland et al. beschriebenen Methode^[4].

4.2 Gentechnische Arbeiten

4.2.1 Arbeit mit gentechnisch veränderten Organismen

Die verwendeten GVO (gentechnisch veränderte Organismen) sind der Sicherheitsstufe 1 des Gentechnik-Gesetzes (GenTG) zuzuordnen. Daher wird mit ihnen nur in den dafür zugelassenen und gekennzeichneten Räumlichkeiten (S1-Räumen) gearbeitet. Durchgeführte Arbeiten werden dokumentiert und aufbewahrt.

4.2.2 Transformation

Das Plasmid IRAP-GFP pcDNA3 soll durch Transformation in E. Coli vervielfältigt werden, um es für Transfektionen an INS-1 Zellen nutzen zu können.

Es wurde von der Arbeitsgruppe Taveré et al. zur Verfügung gestellt und wurde getrocknet auf einem Filterpapier versandt, von dem es mit Tris EDTA (TE)-Puffer resolubilisiert wurde. Die erhaltene Lösung enthält ausreichend Plasmid um eine Transformation durchzuführen.

Die direkte Aufnahme von DNA-Molekülen in ein Bakterium und die stabile Weitergabe dieser Information wird Transformation genannt. Einige Bakterienstämme, insbesondere grampositive, wie z.B. *Streptococcus pneumoniae*,

besitzen die Eigenschaft DNA ohne Vorbehandlung aufzunehmen. Diese Eigenschaft wird als natürliche Kompetenz bezeichnet.

In der Molekularbiologie macht man sich diese Eigenschaft zu Nutze um Plasmid-DNA zu vervielfältigen. Als Expressionssystem wird häufig das gramnegative Bakterium *Escherichia Coli* genutzt. *E. Coli* besitzt keine natürliche Kompetenz, kann aber durch verschiedene physikalische oder chemische Methoden Kompetenz erlangen.

Die Standardmethode zur Erzeugung kompetenter *E. Coli* ist das Verfahren nach Hanahan. Es handelt sich dabei um eine chemische Methode, bei der *E. Coli* K12 Stämme bei 4 °C mit einer Calciumchloridlösung behandelt werden. Es wird vermutet, dass die Zellwandstruktur des Bakteriums durch den Zusatz der Calciumsalze porös und durchlässig wird.

Eine zugesetzte DNA-Probe fällt als schwerlösliches Calciumsalz auf der Zelloberfläche aus. Die präzipitierte Plasmid-DNA kann dann durch Endozytose während der exponentiellen Wachstumsphase in das Bakterium aufgenommen werden. So behandelte *E. Coli* Bakterien zeigen eine Transformationseffizienz von bis zu 10^7 - 10^8 Transformanten / μg DNA und können bei -70 °C gelagert werden.

Für die von uns durchgeführten Transformationen werden bereits kompetente *E. Coli* (DH5 α) der Firma Invitrogen[®] eingesetzt. Alle Arbeiten erfolgen, wenn nicht anders beschrieben, auf Eis.

Die DH5 α werden auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit dem Finger gevortext. 50 μl der Bakteriensuspension werden in ein steriles Eppendorf Tube überführt, mit 2 μl der wässrigen IRAP-GFP pcDNA3 Plasmid-DNA Lösung versetzt und mit dem Finger gevortext. Dieser Ansatz wird 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 42 °C für 20 Sekunden im Thermomixer einem Hitzeschock unterzogen. Die Zellwand wird in der Wärme porös und DNA Präzipitate gelangen in das Bakterium. Anschließend wird der Ansatz 2 Minuten auf Eis inkubiert und mit 950 μl vorgewärmten SOC-Medium aufgefüllt. Diese Bakteriensuspension wird dann auf einer vorgewärmten Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte (100 μg / ml) ausgebracht.

Die LB-Agarplatte wird mit 20 bis 200 μl des Ansatzes beimpft und die Suspension mit einer Impfschlinge in Form eines 8 Ösen-Ausstriches homogen verteilt. Empfehlenswert ist es, zwei unterschiedliche Volumina einzusetzen, um zu gewährleisten, dass auf einer der Platten die *E. Coli* Kolonien ausreichend vereinzelt wachsen. Die LB-Agarplatte wird über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wird eine einzelne Bakterienkolonie mit einer Impfschlinge von der Platte abgenommen, in ca. 100 ml Ampicillin-haltigem LB-Broth-Medium (100 µg / ml) resuspendiert und für etwa 17 h bei 37 °C in einem Hybridofen kultiviert und vermehrt. Die Isolierung und Aufreinigung des in den Bakterien vermehrten IRAP-GFP pcDNA Plasmids erfolgt nach Herstellerprotokoll mit dem Qiagen[®] Midi Kit.

4.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Reinheit und der Gehalt der durch die Transformation gewonnenen Plasmid-DNA wird photometrisch bestimmt.

Ein Aliquot der DNA-Lösung aus der Midi Präparation wird 1/100 bis 1/200 mit Aqua bidest. verdünnt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt photometrisch in einer Plastikküvette mit 1 cm Schichtdicke bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀). Bei einer Extinktion von 1 entspricht dies in etwa einer DNA-Konzentration von 50 µg / ml. Um den Reinheitsgrad der DNA-Lösung zu ermitteln, wird der Quotient der Extinktion bei OD₂₆₀ / OD₂₈₀ bestimmt. Der errechnete Wert sollte für eine reine DNA-Präparation bei 1,8 - 2,0 liegen. Liegt der Wert darunter, so weist dies auf eine Kontamination der Probe durch Proteine hin, während ein Quotient > 2 für eine Verunreinigung durch RNA spricht.

4.2.4 Transfektion

Das Einbringen von heterologer DNA in eukaryotische Zelllinien wird als Transfektion bezeichnet. Dies geschieht in der Regel nicht mit reiner, unbehandelter DNA. Sie wird vielmehr in Form von Präzipitaten, Komplexen mit Polymeren oder eingeschlossen in Liposomen aktiv in die Zelle eingeschleust. Weitere Methoden DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen sind die Elektroporation, also das Einschleusen durch Strom, oder das Einbringen mit einer Genkanone, bei dem DNA auf Goldpartikel aufgezogen wird und mit einer Pistole in das Gewebe geschossen wird. Die Transfektionseffizienz variiert je nach Zellart und Transfektionsreagenz bzw. -methode.

Für die Transfektion der INS-1 Zelllinie werden liposomale Transfektionsreagenzien der Firma Hoffman La Roche[®] verwendet. Es kommt das kationische Lipidgemisch Fugene[®]6 zum Einsatz. Es bildet mit der negativ geladenen Plasmid-DNA stabile Komplexe, die aktiv von der Zelle aufgenommen werden. Die Plasmid-DNA wird in

den erfolgreich transfizierten Zellen in mRNA transkribiert, welche dann an den Ribosomen in das entsprechende Protein translatiert wird.

4.2.4.1 Transiente Transfektion

Die INS-1 Zellen werden in sterilen 8-Well-Kammerdeckgläser ($0,9 \times 10^5$ Zellen / Well) ca. 70 % konfluent in 0,4 ml Vollmedium ausgesät und inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel auf 0,4 ml serumfreies Medium. Für den Transfektionsansatz werden 97 μ l serumfreies Medium in ein Eppendorf Tube vorgelegt, mit 3 μ l Fugene[®]6 gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird 1 μ g Plasmid-DNA zugefügt, mit dem Finger gevortext und 20 Minuten bei 20°C inkubiert. Während der Inkubationszeit bildet sich ein Komplex aus DNA und Fugene[®]6. Ein Volumen von 10 μ l des Transfektionsansatzes wird pro Well zupipettiert und verbleibt für 4 Stunden auf den adhärennten INS-1 Zellen. Nach 4 Stunden wird das serumfreie Medium abgesaugt und durch 0,4 ml Vollmedium ersetzt. Pro Transfektionsansatz befinden sich 0,3 μ l Fugene[®]6 und 0,1 μ g DNA in einem DNA/Fugene[®]6 Verhältnis von 1/3 im Well. Die Zellversuche können 48 - 72 Stunden nach der Transfektion durchgeführt werden, da das eingeschleuste Plasmid nur für eine begrenzte Dauer in der Zelle exprimiert wird. Zelleigene DNAsen verdauen die fremde DNA und die Proteinexpression kommt zum Erliegen.

4.2.4.2 Stabile Transfektion

Der Vorteil einer stabilen Transfektion ist die dauerhafte Expression des eingeschleusten Plasmids. Um INS-1 Zellen stabil zu transfizieren, werden sie in 24er Multiwellplatten ausgesät ($1,75 \times 10^5$ Zellen / Well) und am folgenden Tag transfiziert. Anders als bei der transienten Transfektion werden bei dieser Methode 20 μ l des Transfektionsansatzes direkt ins serumhaltige Medium pipettiert. Das

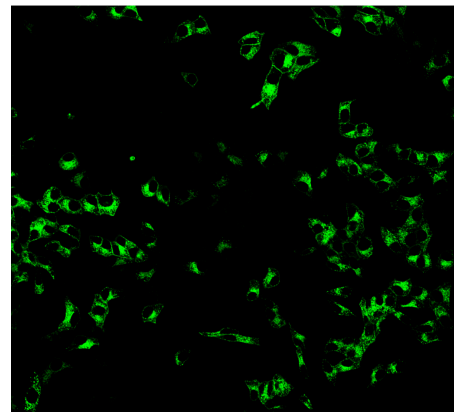


Abbildung 4-1: Stabil transfizierte INS-1 Zellen mit dem Insert IRAP-GFP

Das DNA / Fugene[®]6 Verhältnis wird nicht verändert. Zu einem sehr kleinen Teil nehmen erfolgreich transfizierte Zellen die DNA stabil in ihr Genom auf. Das in das Genom

integrierte Plasmid enthält ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Geneticin (G418). Geneticin tötet in einer Konzentration von 200 µg / ml INS-1 Zellen, die nicht stabil transfiziert werden, erfolgreich ab. Daher wird nach einer fünftägigen Kultivierung der transfizierten Zellen ein Mediumwechsel auf das Geneticin-haltige Selektionsmedium (200 µg / ml) durchgeführt. Nach 20 Tagen werden die Geneticin-resistenten Zellen mit Trypsin von der 24er Multiwellplatte abgelöst, bei 1000 U / min zentrifugiert, resuspendiert und in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Der Selektionsdruck wird weiterhin aufrechterhalten (100 µg / ml) da auch stabil transfizierte Zellen gelegentlich dazu neigen die integrierte DNA wieder auszuschleusen.

Auf diesem Wege entstand die stabil transfiziert INS-1 Zelllinien mit dem Insert IRAP-GFP.

4.2.5 Real Time PCR

Der Expressionsstatus des Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) in INS-1 Zellen und in ausdifferenzierten 3T3-L1 Adipozyten wird mit Hilfe einer zwei-Schritt Real-Time PCR bestimmt. Zunächst wird dabei die isolierte RNA in cDNA transkribiert, welche dann in der eigentlichen Real Time PCR quantifiziert werden kann.

Zellaussaat und Inkubation

Die Zellaussaat erfolgt auf 6er Multiwellplatten (10⁶ Zellen / Well). Inkubiert werden die Zellen in serumfreiem Vollmedium unter Zusatz von ANG IV, IL-1β (5 ng / ml) als Positivkontrolle sowie PBS zur Ermittlung der Standardexpression im unstimulierten Zustand. Als Inkubationszeiten werden 3 und 12 Stunden gewählt.

Isolierung und Aufreinigung der zellulären RNA

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Lysieren und Aufreinigen der Zellen erfolgt nach einem Standardprotokoll für Zelllinien mit dem Qiagen[®] RNeasy Mini Kit. Nach der photometrischen Gehaltsbestimmung der aufkonzentrierten und gereinigten mRNA werden die Proben direkt für die reverse Transkription benutzt oder für die spätere Analytik bei -20 °C tiefgefroren.

Entfernung der genomischen DNA und reverse Transkription

Die Entfernung restlicher genomischer DNA als auch die reverse Transkription der mRNA wird nach dem Standardprotokoll des Qiagen® QuantiTect Reverse Transcription Kits durchgeführt. Für die Transkription der mRNA in cDNA werden 0,5 - 0,8 µg der aufgereinigten RNA-Proben eingesetzt.

Real Time PCR Messung mittels SYBR-Green Detektion

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA. Bei der Amplifikation der Target-cDNA mit Hilfe spezifischer Primer interkaliert SYBR-Green in die neu gebildete doppelsträngige DNA und emittiert, nach Anregung bei einer Wellenlänge von 494 nm, bei einer Wellenlänge von 521 nm ein grünes Fluoreszenzsignal. Die Signalstärke nimmt mit jedem durchlaufenem PCR-Zyklus proportional zur gebildeten cDNA-Menge zu.

Pro Well werden auf einer 96 Multiwell PCR-Platte 22,5 µl Mastermix, der die DNA-Polymerase, die Nukleotide, die jeweiligen für das Targetgen spezifischen Primer sowie den SYBR-Green Farbstoff in dem nach Qiagen® QuantiTect SYBR-Green PCR Kit Standardprotokoll vorgegebenen Verhältnis enthält, mit 2,5 µl der cDNA Probe versetzt. Dabei wird jede Probe auf den Expressionsstatus des Targetgens PAI-1 sowie auf den Expressionsstatus des Referenzgens 18S-rRNA, die RNA der ribosomalen Untereinheit 18S, untersucht. Das Referenzgen wird konstitutiv in der Zelle exprimiert und unterliegt unter den Versuchsbedingungen keiner Expressionsschwankung.

Die Wells werden mit Plastikkappen verschlossen, um ein Eintrocknen der Proben während der Messung zu verhindern. Im Anschluss werden die cDNA-Proben in einem Thermo Cycle 5300 der Firma Applied Biosystems nach dem im Protokoll vorgegebenen Temperaturprogramm amplifiziert und fluorimetrisch vermessen.

Relative Quantifizierung

Während der Extensionsphase jedes PCR-Zyklus, also immer dann, wenn die DNA doppelsträngig vorliegt, wird die Fluoreszenzintensität bestimmt. Der Cycle, in dem eine vorher festgelegte Fluoreszenzschwelle erstmalig überschritten wird, wird als Threshold Cycle (C_T) bezeichnet. Dieser C_T -Wert wird bei Proben die eine hohe Konzentration cDNA des Targetgens aufweisen früh erreicht und bei Proben die

wenig cDNA des Targetgens enthalten erst nach einer hohen Cyclezahl überschritten.

Die relative Quantifizierung erlaubt Aussagen darüber, wie viel stärker oder schwächer das Targetgen bezogen auf die nicht stimulierte Kontrollprobe exprimiert wird.

Hierzu wird der C_T -Wert des Targetgens (PAI-1) vom C_T -Wert des Referenzgenes (18S-rRNA) einer cDNA-Probe subtrahiert. Man erhält so den ΔC_T -Wert. Pipettierungenauigkeiten können so minimiert werden. Nun werden die ΔC_T -Werte in der Targetgengruppe verglichen. Der ΔC_T -Wert der unstimulierten Probe wird vom ΔC_T -Wert der stimulierten Probe subtrahiert. Dies ergibt den $\Delta\Delta C_T$ -Wert. Die Vervielfältigung der cDNA verläuft jedoch exponentiell. Dies wird bei der Berechnung der relativen cDNA-Menge in der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ berücksichtigt. Als Ergebnis kann so die Expressionssteigerung oder -minderung im Vergleich zu einer nicht stimulierten Kontrolle angegeben werden.

Kontrolle der Primerspezifität

Die Spezifität der verwendeten Primer (PAI-1 und 18S-rRNA) wird durch eine etwa 45 minütige Gelelektrophorese der amplifizierten Proben in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel (2 %) bei einer angelegten Spannung von 35 V untersucht. Die Primer sind selektiv, wenn unter dem UV-Licht nur eine DNA-Bande, sprich eine selektive amplifizierte cDNA, auf dem Agarosegel zu erkennen ist.

4.3 Western Blot

4.3.1 Zellaufarbeitung

Der Nachweis des AT₄-Rezeptors / IRAP sowie des GLUT4-Transporters erfolgt mittels Western Blot. Als Referenzzellen dienen 3T3-L1 Fibroblasten, die sowohl den AT₄-Rezeptor / IRAP als auch den GLUT4-Transporter exprimieren.

INS-1 Zellen werden in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und fünf Tage kultiviert. Die Zellen werden zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, mit einem Zellschaber von der Zellkulturflasche abgelöst und in 5 ml PBS-Puffer überführt. Insgesamt werden zwei Zellkulturflaschen geerntet und die erhaltene Zellsuspension 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 10 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird dann 3 x 30 Sekunden im Soni-Prep homogenisiert. Danach wird der Überstand eine Stunde bei 13000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird für die SDS-Page verwendet.

4.3.2 Gelelektrophorese und SDS-Page

SDS-Page

Die gelelektrophoretische Trennung von Proteinen erfolgt mit Hilfe der eindimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli^[193]. Die Proteine werden dabei nach Zusatz des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) in Anwesenheit des Cysteinbrücken-spaltenden Thiolreagenz Dithiothreitol (DTT) nach Molekülgröße aufgetrennt. Hierbei erfolgt eine vollständige Entfaltung der Proteine und durch hydrophobe Wechselwirkungen eine gleichmäßige Beladung der Peptidketten mit dem negativ geladenen SDS. Als Trennmedium dient in diesem Fall ein engporiges 7,5 % iges Trenngel, auf welches ein großporiges 4 % iges Sammelgel aufgelagert ist. Die Wahl eines höherprozentigen Trenngels birgt die Gefahr, dass der AT₄-Rezeptor / IRAP nicht in das Gel einzudringen vermag.

Für die SDS-PAGE wird eine selbstgebaute, vertikale Apparatur verwendet. Der Probenkamm wird vorsichtig entfernt und die Probenaschen mehrmals mit Aqua bidest. gespült. Das sich zwischen den beiden Glasplatten befindende Gel wird nach Entfernen des U-förmigen Spacers in die mit Anodenpuffer befüllte, untere Pufferkammer gestellt, so dass sich keine Luftblasen zwischen den Glasplatten unterhalb des Gels befinden, und mit Klammern fixiert. Anschließend wird die obere Pufferkammer mit Kathodenpuffer gefüllt. Bevor die Proben in die dafür

vorgesehenen Probenaschen eingefüllt werden, versetzt man sie 1:1 mit Probenpuffer (2x) und erhitzt sie für drei Minuten im Thermoblock bei 95 °C. Hierbei kommt es zur Denaturierung der Proteine und zur Spaltung der Disulfidbrücken. Nach dem Befüllen der Probenaschen wird die Elektrophorese über circa 5 Stunden bei 4 °C und konstanter Stromstärke von 25 mA durchgeführt. Als Größenstandard dienen 10 µl Prestained SDS-PAGE Standards, high range der Firma Biorad. Die erhaltenen Proteinbanden können so später einem Größenvergleich zugeführt werden. Hierbei sollte die Laufstrecke möglichst 10 cm betragen.

Western Blot

Der anschließende Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgt mit Hilfe eines SemiDry-Blotting Systems. Hierfür wird das Gel 30 Minuten im Blottingpuffer umäquiliert und die Filterpapiere sowie die Nitrocellulosemembran in dem gleichen Puffer befeuchtet. Aus den genannten Komponenten wird dann das Blot-Sandwich in folgender Reihenfolge aufgebaut: Anode, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Gel, Filterpapier, Kathode. Eine angelegte Stromstärke von 3 mA / cm² für 30 Minuten sorgt für einen quantitativen Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran.

Der Nachweis des AT₄-Rezeptors erfolgt mit Hilfe eines im Kaninchen erzeugten affinitätsgereinigten spezifischen Antikörpers gegen die N-terminale zytoplasmatische Domäne.

Detektion

Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran wird die Membran über Nacht bei 4 °C in phosphatgepufferter Salzlösung mit Tween (PBST) und 5 % Magermilchpulver geschüttelt. Am nächsten Tag wird die Membran 10 Minuten mit PBST gewaschen und mit dem AT₄-Rezeptor-Antikörper in einer Verdünnung von 1 / 250 in PBST mit 2 % Magermilchpulver für 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 3 x 5 ml PBST für jeweils 10 Minuten erfolgt die Kopplung des polyklonalen Sekundärantikörpers an den Antigen-Primärantikörper-Komplex. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen die Spezies, in diesem Fall Kaninchen, in der der Primärantikörper erzeugt wurde. Er ist mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, welche das Reagenz Luminol umsetzt. Bei dieser Umsetzung wird Licht emittiert, welches zur Schwärzung des Röntgenfilms als Signal führt.

Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgt in einer Verdünnung von 1 / 20000 für 1 Stunde. Danach wird erneut 3 x 10 Minuten mit 5 ml PBST gewaschen und die eigentliche Detektion erfolgt mit Hilfe des ECL (enhanced chemiluminescence) Kit®.

Für die Detektion werden die Lösungen I und II des ECL-Kit® 1:1 gemischt und die Membran damit 1 Minute inkubiert. Die so präparierte Membran belichtet dann in einer Fotokassette für 20 Minuten einen Röntgenfilmstreifen. Nach der Belichtung wird der Röntgenfilm entwickelt und mit Hilfe der Marker und deren R_f -Werte ausgewertet.

4.4 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Um die subzelluläre Verteilung der Insulin regulierten Aminopeptidase (IRAP) und die Translokation der IRAP-haltigen Vesikel in INS-1 Zellen zu ermitteln, wird das Plasmid mit dem cDNA-Insert IRAP-GFP im Expressionsvektor pcDNA3 in die Zelllinie transient oder stabil transfiziert. Das Insert des Plasmids codiert für den intrazellulären Teil von

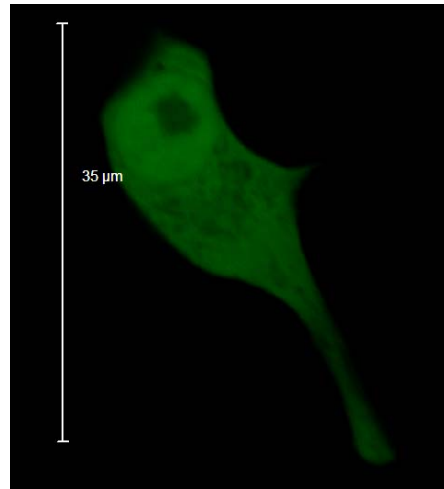


Abbildung 4-2: Größenvergleich einer GFP-transfizierten INS-1 Zelle

IRAP, der für die zelluläre Lokalisation der Aminopeptidase verantwortlich ist. Als Reportergen dient das Grüne Fluoreszenz Protein (GFP) aus der Quale *Aequorea victoria*, das mit dem IRAP-Gen fusioniert wurde. Dieses Protein emittiert nach Anregung durch Licht der Wellenlänge 488 nm grünes Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 512 nm und ermöglicht somit die Betrachtung einzelner Zellen im konfokalen System. In Abbildung 4-2 ist eine GFP-transfizierte INS-1 Zelle mit Größenskalierung abgebildet.

Die Arbeiten finden an dem Gerät TCS SP2 AOBS[®] der Firma Leica[®] statt. Hierzu werden Zellen auf Kammerdeckgläser der Firma Nunc[®] ausgesät. Transient transfizierte INS-1 Zellen können nach 48 Stunden Kultivierung unter dem konfokalen Mikroskop beobachtet werden, da sie nun das transfizierte Protein in ausreichender Menge exprimieren. Stabil transfizierte Zellen können nach der Aussaat nach Bedarf untersucht werden. Hierzu werden die Zellen mit KRH-Puffer (+ 1 % BSA) gewaschen und für die Untersuchungen zur vesikulären Speicherung der Aminopeptidase mit den zu untersuchenden Substanzen versetzt und inkubiert. Die Inkubationszeit richtet sich nach der jeweils eingesetzten Substanz.

Für die Anregung des GFP-Proteins wird ein vorinstalliertes Filtersetup verwendet. Das Fusionsprotein wird mit Argon-, und Helium-Neon-Lasern der Wellenlänge 488 nm angeregt. Die Detektion findet bei einer Wellenlänge von 512 nm statt. Ein Öl-Immersionsobjektiv mit einer 100 fachen Vergrößerung dient der Betrachtung.

4.4.1 Prinzip der konfokalen Mikroskopie

Im Jahre 1955 entwickelte Marvin Lee Minsky das erste konfokale Rastermikroskop. Moderne Geräte arbeiten mit hochfrequenten scharf begrenzten Laserlinien z.B. Argon-, Argon / Krypton-, oder Helium-Neon-Lasern verschiedener Wellenlänge (Abbildung 4-3). Dieses Laserlicht wird an einem dichromatischen Spiegel (Beamsplitter)

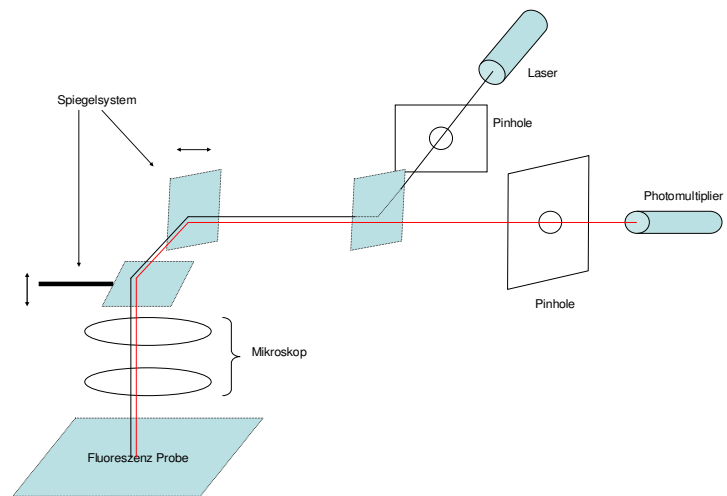


Abbildung 4-3: Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskops

reflektiert, gelangt über ein motorisches Spiegelsystem durch das Objektiv und scannt die Probe sequentiell. Das längerwellige Licht des Fluorophors der Probe hingegen gelangt über das Objektiv durch das Spiegelsystem, passiert den Beamsplitter und wird von Photomultipliern detektiert. Der Unterschied zur Epifluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass nicht das gesamte Objekt gleichzeitig bestrahlt wird, sondern daß das Bild punktwise durch einen sequentiellen Scan aufgenommen wird. Dies geschieht über vertikale und horizontale Spiegel, die den Laserstrahl über das Objekt bewegen. Streulicht aus anderen Bereichen des Objektes, welches die Bildschärfe beeinflussen würde, kann somit weitestgehend ausgeblendet werden.

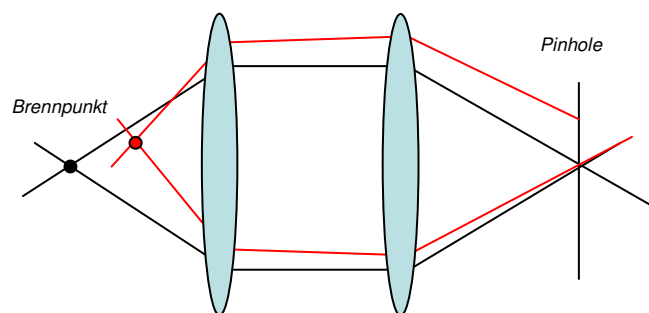


Abbildung 4-4: Linsensystem eines konfokalen Mikroskops

Eine weitere Verbesserung ist das konfokale Linsensystem kombiniert mit zwei Lochblenden (Abbildung 4-4). Eine der Lochblenden befindet sich vor der Lichtquelle. Sie ermöglicht die selektive Beleuchtung des Brennpunktes. Emittiertes Licht der

fluoreszierenden Probe gelangt über die zweite Lochblende in den Detektor. Die beiden Blenden reduzieren signifikant die Hintergrundfluoreszenz aus tiefer oder höher gelegenen Ebenen des Präparates, die bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie die Bildqualität reduziert. Da der Brennpunkt der Objektivlinse in der Lochblende des Detektors ein Bild der Probe erzeugt, bezeichnet man diese beiden Punkte als „konjugierte Punkte“. Die Lochblende konjugiert mit dem Fokus der Linse, daher der Begriff „konfokal“.

4.5 Radioaktive Methoden

4.5.1 Die $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme

Der Einfluss von ANG IV und seinem Antagonisten Divalinal-ANG IV auf den Influx des radioaktiven Isotops $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in INS-1 Zellen soll durch diese Methode dargestellt werden.

Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle sind für die Glukose-induzierte Insulinsekretion essentiell. Nach Nahrungsaufnahme steigt über den insulinunabhängigen Glukosetransporter GLUT2 die Glukosekonzentration im Zytosol der β -Zelle auf Werte an, die der Glukosekonzentration des Blutes entsprechen. Die Glukose wird in der β -Zelle über das Enzym Glukokinase zu den Endprodukten ATP, NADH und Pyruvat verstoffwechselt. Der Anstieg des zytosolischen ATP-Spiegels bewirkt das Schließen ATP-abhängiger K^+ -Kanäle (K_{ATP} -Kanäle) in der Zellmembran. Es kommt zur Depolarisation der Zelle und zum Öffnen spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle. Der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration initiiert die Exozytose von Insulingranula. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann jedoch auch durch Mobilisierung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Inositol-trisphosphat-sensitiven Pool, erfolgen.

Der Versuch wird in 24er Multiwellplatten an konfluent gewachsenen INS-1 Zellen (Tag 5 - 6) in vierfach Bestimmung durchgeführt. Das Kulturmedium wird entfernt, die Zellen zweimal mit 500 μl KRH-Puffer gewaschen und dann für 20 Minuten mit einem 3,0 mM Glukose KRH-Puffer bei 37 °C eingestellt. Danach werden die Zellen zweimal mit 500 μl KRH-Puffer gewaschen und für 2,5 Minuten mit 250 μl eines 5,6 mM Glukose KRH-Puffer inkubiert, dem 0,95 μCi $^{45}\text{Ca}^{2+}$ zugesetzt wurden. Nach der Inkubationszeit werden 125 μl des radioaktiven Überstands abgenommen und analog der Zellsuspension in Szintillationsgefäße überführt. Der Rest des Überstands wird verworfen, der Zellrasen zweimal mit 500 μl KRH-Puffer gewaschen und die Zellen mit 200 μl einer 0,1 % igen SDS-Lösung 30 Minuten lysiert. Die Zellsuspension wird unter zweimaligem Spülen mit 200 μl einer 0,1 % igen SDS-Lösung in Szintillationsgefäße überführt. Der Überstand und das Zelllysat werden mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Beta-Counter vermessen. Das aus dem Verhältnis aus intrazellulärer Radioaktivität zur Radioaktivität im Überstand ermittelte Ergebnis, ergibt die relative Menge an aufgenommenem $^{45}\text{Ca}^{2+}$.

Kinetikversuche mit 5,6 mM Glukoselösung über 10 Minuten zeigen, dass der optimale Messzeitpunkt bei 2,5 Minuten liegt. Hier ist die Steigung in der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme maximal, und damit der Effekt von Testsubstanzen auf den $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Influx am deutlichsten zu erkennen^[194]. Nifedipin, ein Ca^{2+} -Kanalmodulator, 40 mM KCl-Lösung und ansteigende Glukosekonzentrationen (3,0 mM \rightarrow 16,7 mM) dienen zur Validierung der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Influxmethode^[194].

4.5.2 Insulinsekretion und RIA

Die Versuche an INS-1 Zellen wurden nach einer bereits etablierten Methode durchgeführt. Die genaue Beschreibung der Methode sowie die Durchführung des RIA findet sich unter Rüsing et al. 2005^[190].

4.6 IRAP-Assay

Dieser Fluoreszenz-basierte Assay dient der Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von IRAP in der Insulinomazelllinie INS-1.

Die katalytische Aktivität von Aminopeptidasen kann durch den Stoffumsatz von Aminosäurederivaten des β -Amino-Naphthalin (NA) bestimmt werden. Für das Enzym IRAP wird als Substrat Leucyl- β -Naphthylamid (Leu-NA) in einer 25 μM Lösung verwendet. Dies entspricht in etwa dem K_M -Wert des Enzyms, so dass sich eine Hemmung der Enzymaktivität im IC_{50} -Wert zeigen muss, während eine Veränderung der Enzymdichte den maximalen Stoffumsatz V_{max} beeinflusst.

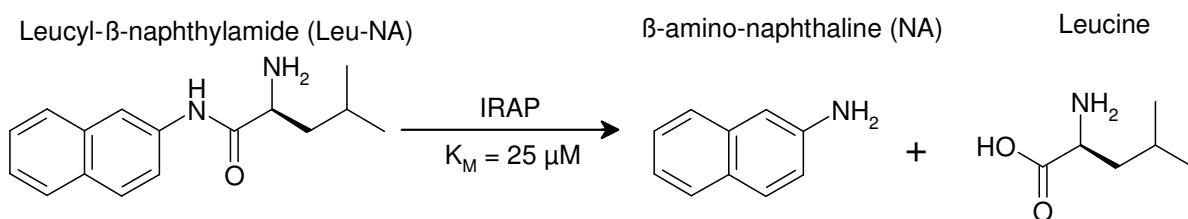


Abbildung 4-5: Katalytische Umsetzung von Leu-NA zu Amino-Naphthalin

Versuchdurchführung

Eine Zellkulturflasche mit INS-1 Zellen oder ausdifferenzierten 3T3-L1 Adipozyten wird mit 5 ml kaltem KRH-Puffer (4 °C) gewaschen und mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die geernteten Zellen werden dann in 15 ml kaltem KRH-Puffer (4 °C) resuspendiert. In eine schwarze 96er Multiwellplatte werden

100 μl Substratlösung (50 μM) vorgelegt und 50 μl Testsubstanz zupipettiert. Die Inkubation beginnt direkt nach Zugabe von 50 μl Zellsuspension. Die Inkubationszeit beträgt 15 Minuten bei 20°C. Die Fluoreszenzintensität wird im Plate Reader bei einer Anregungswellenlänge von 330 nm und einer Emissionswellenlänge von 390 nm ermittelt. Sie ist proportional der entstandenen Menge NA abzüglich der Fluoreszenzintensität eines Leerwerts ohne Zellzusatz. Die Linearität der Methode wurde durch eine Amino-Naphthalin Kalibrationsgerade dargestellt und ermöglicht, wenn gewünscht, eine quantitative Auswertung des Assays.

Die Methode wird durch eine EDTA-Positivkontrolle abgesichert. EDTA führt durch Komplexbildung freier Zink-Ionen zu einer vollständigen Inhibierung der katalytischen Aktivität des Enzyms. Hierzu werden 50 μl einer 0,1 M EDTA-Lösung mit der Zellsuspension und dem Substrat auf der 96er Multiwellplatte inkubiert.

4.7 *In vivo*-Versuche

4.7.1 Glukosetoleranztest (GTT)

Die Effekte von ANG IV auf Veränderungen des Blutglukose- und Plasmainsulinspiegels nach einem Glukosebolus wurden an Wistarratten getestet. Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren das Futter entzogen. Die Ratten wurden durch intraperitoneale (i.p.) Urethan-Gabe (1,8 – 2 g / kg KG) narkotisiert und ANG IV oder Kochsalzlösung wurde i.v. über einen Katheter in die Vena jugularis appliziert. Zeitgleich wurden 3000 μl / kg KG einer konzentrierten Glukoselösung (66,67 g / L) i.p. verabreicht. Die Blutentnahmen erfolgten retrobulbär zu den Messzeitpunkten 0, 5, 15, 45, 90 und 180 Minuten. Für die Glukosebestimmung wurde Vollblut verwendet, die Insulinbestimmung erfolgte aus Plasma, welches durch Zentrifugation aus heparinisiertem Vollblut gewonnen wurde.

4.7.2 Blutglukosebestimmung

Die quantitative Glukosebestimmung erfolgt nach der Hexokinase-Methode mit Hilfe des Testkits Glukoquant[®] von Roche Diagnostics. Dabei werden 20 μl Vollblut sofort nach Entnahme mit 1000 μl Hämolyse-Reagenz versetzt. Die in diesem Reagenz enthaltene Hexokinase setzt Glukose unter ATP-Verbrauch zu Glukose-6-Phosphat um. Die aktivierte Glukose wird weiter mit NAD(P)⁺ durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu Glukonat-6-Phosphat, NAD(P)H und H⁺

umgesetzt. Pro Mol Glukose entsteht dabei ein Mol NAD(P)H, welches UV-photometrisch bei 340 nm vermessen wird.

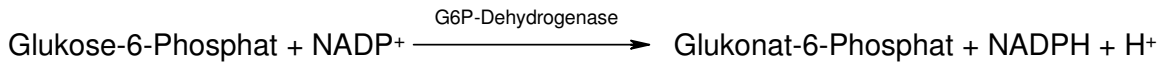
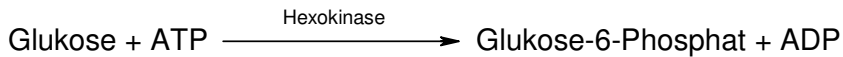


Abbildung 4-6: Nachweisreaktion zur Blutglukosebestimmung

4.7.3 Plasmainsulinbestimmung

Um Plasma zu gewinnen wird retrobulbär gewonnenes Vollblut (ca. 0,5 ml) mit 50 µl Heparin (25000 U / ml) versetzt, 5 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert und anschließend das Plasma abgenommen. Die so gewonnenen Plasmaproben werden analog den Insulinsekretionsproben vorbereitet und der Insulingehalt im Radioimmunoassay (RIA) bestimmt.

Versuche, bei denen die Glukose-Bolusgabe keine Steigerung des Blutglukosewerts und der Insulinsekretion zeigt, werden von der Auswertung ausgeschlossen. Die Werte die zu dem Meßzeitpunkt 180 Minuten gewonnen werden, gehen nicht mit in die Gesamtauswertung ein, da einige Tiere unter der langen Narkose verstarben.

4.8 HPLC-MS

4.8.1 Qualitative HPLC-MS

Um zu untersuchen, welche Angiotensin Peptide in Gegenwart von INS-1 Zellen gebildet werden können, werden die Zellen in 24er Multiwellplatten über 5 Tage kultiviert. Der Versuch erfolgt am 5 oder 6 Tag der Kultivierung.

Der Zellrasen wird dreifach mit KRH-Puffer gewaschen und mit 300 μl KRH-Puffer + 100 μM Ligand (in KRH-Puffer) bei 37°C inkubiert. Nach 2 und 4 Stunden werden 300 μl des Ansatzes entnommen und bei -20°C aufbewahrt. Die Proben werden kurz vor der Analyse aufgetaut und in Glas-Vials für die HPLC überführt.

Die Auswertung der Massenspektren gibt Aufschluss über die entstandenen Angiotensin Peptide und über die Art der abbauenden Enzyme.

HPLC-ESI-MS von Angiotensin Peptiden

Die Trennung der Peptide erfolgt mittels eines hydrophilen Lösungsmittelgemisches aus Acetonitril und Ammoniumformiatpuffer unter Zusatz von Ameisensäure. Der Säurezusatz gewährleistet eine vollständige Protonierung der basischen

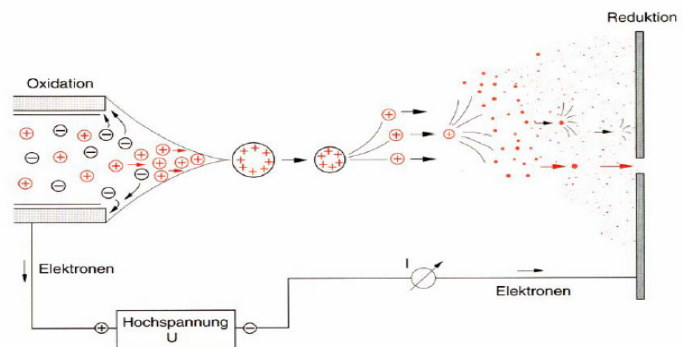


Abbildung 4-7: Darstellung der Ionisierung durch ESI

AS. Hydrophile Peptide werden so schnell von der hydrophoben Säule eluiert. Peptide, die weniger stark protoniert sind, verbleiben länger auf der stationären Phase und werden erst später eluiert.

Die Protonierung des Fließmittels ist auch für die Ionisierung der Probe bei der Elektrospray-Ionisation (ESI) erforderlich. Die ESI ist eine sehr schonende Ionisationsmethode, bei der es kaum zur Fragmentierung des Analyten kommt. Daher eignet sie sich speziell für die Analyse von Biomoleküle und Peptiden. Bei der ESI tritt das HPLC-Eluat über eine Metallkapillare in das Massenspektrometer ein. Durch ein Hochspannungsfeld zwischen der Kapillarspitze und einer Gegenelektrode kommt es zur Zerstäubung der Probe. Das elektrische Feld durchdringt die

Analytlösung und in ihr befindliche Ionen bewegen sich elektrophoretisch auf die Gegenelektrode zu. Dabei bildet sich an der Spitze der Kapillare ein Überschuss gleichartig geladener Ionen, die sich gegenseitig abstoßen und über die Bildung eines Taylor-Kegels als feines Aerosol aus der Kapillare austreten. Das Trägergas sorgt für die Verdunstung des Lösungsmittels und die Vernebelung des Sprays. Aufgrund der Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert sich die Tropfengröße, während die Dichte des elektrischen Feldes auf der Tropfenoberfläche zunimmt. Wenn der Radius der Tropfen kleiner als das sogenannte Rayleigh-Limit wird, zerfallen die Tropfen in kleinere Tröpfchen. Diese Molekülcluster zerfallen letztendlich in vielfach geladene Ionen, die im Detektor, einem Photomultiplier, detektiert werden (siehe Abbildung 4-7).

HPLC Bedingungen

Stationäre Phase	Phenomenex Synergie 75 x 2 mm, 4 µM, Hydro-RP 80
Fluss	0,5 ml / min
Injektionsvolumen	30 µl
Mobile Phase	A: Acetonitril: 20 mM Ammoniumformiat Puffer (2 : 98) mit 0,1 % HCOOH B: Acetonitril: 20 mM Ammoniumformiat Puffer (85 : 15) mit 0,1 % HCOOH
UV-Detektor	215 nm
Software	Xcalibur
Gradient	

Elektrospray Ionisationsquelle

t_{min}	A	B
0	100	0
30	70	30
35	100	0
40	100	0

Spray Voltage (KV)	3
Sheet gas flow rate (arb)	80
Aux gas flow rate (arb)	0
Capillary voltage (V)	5
Capillary temperature (°C)	200
Tube lens offset (V)	10

4.8.2 Quantitative HPLC-MS

Da die physiologische Wirkung von ANG IV auf die β -Zelle im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit genauer untersucht werden soll, interessiert die Menge an ANG IV, die durch enzymatische Aktivität an der INS-1 Zelle gebildet werden kann.

Hierzu wird eine ANG IV-Stocklösung (400 μ M) hergestellt, aus der die

Kalibriergerade erstellt wird (0 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 120 μ M). Die Richtigkeit der Methode wird durch eine 6-fach Bestimmung unabhängiger Kontrollenproben ermittelt. Die Kalibrationslösungen werden in Matrixpuffer (KRH-Puffer ohne BSA, der 4 Stunden auf den Zellen vorinkubiert wurde) angesetzt, und mit Sarile als internem Standard versetzt. Sarile, ein synthetisches ANG II-Analogon kann aufgrund seines Molekulargewichts nicht in Fragmente zerlegt werden, die durch den Abbau von Angiotensin Peptiden entstehen würden. Die Quantifizierung erfolgt durch Bildung des Verhältnisses aus Peakfläche ANG IV und Peakfläche Sarile mit der Software Xcalibur. Durch dieses Verfahren kann die Ungenauigkeit des Probenvolumens, das durch den Photomultiplier erfasst wird, bedingt durch das Ionisationsverfahren und die Ionenfalle, ausgeglichen werden. Die Linearität und Nachweisgrenze der Methode in Matrixpuffer konnte bis 1 μ M ANG IV gezeigt werden. Die Einstellungen der ESI-Quelle werden gegenüber der qualitativen Messung nicht verändert. Allerdings werden die quantitativen Messungen mit einer ACE3C18 100 x 2,1 mm, 3 μ M-Säule durchgeführt. Außerdem wird ein hydrophileres Fließmittel (**A**: ddH₂O + 0,1 % HCOOH) verwendet, und der Gradienten um einem Spülschritt nach 16 Minuten (**A**: 30 % / **B**: 70 %) erweitert. Die Laufzeit reduziert sich so von 40 auf 20 Minuten.

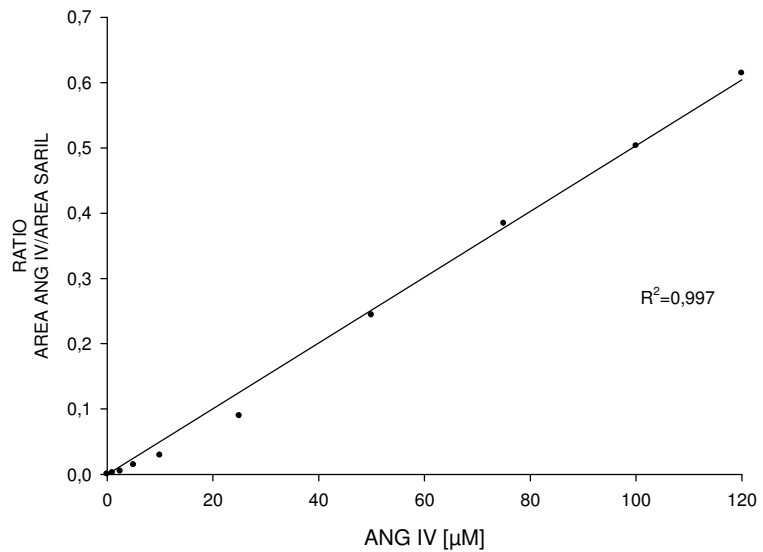


Abbildung 4-8: Kalibriergerade von ANG IV in Matrixpuffer

4.9 Statistik

Die dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Bei der Auswertung der Ergebnisse werden Ausreißer nach der zwei σ -Regel nicht mit einbezogen. Grundlage ist die angegebene Anzahl n der unabhängigen Versuche. Die statistische Auswertung wird mit der Einweg-Varianz-Analyse (ANOVA) und anschließendem t-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant gelten Werte, bei denen $p < 0,05$ ist.

Die statistische Auswertung der *in vivo*-Versuche erfolgt mit dem Programm GraphPad Prism (Summe of Square-Vergleich) mittels F-Test. Hier werden die Kurvenverläufe als Ganzes miteinander verglichen.

4.10 Methodenbewertung / -kritik

4.10.1 PAI-1-Genexpression

Die PAI-1 mRNA-Expression ist in der INS-1 Zelllinie nicht nachgewiesen, in menschlichen Pankreaskarzinomen wurde das PAI-1-Protein aber schon identifiziert^[195]. Vorab muss kritisch angemerkt werden, dass sich eine Krebszelllinie, wie die INS-1 Zelllinie, bezüglich ihrer Genexpression von primären β -Zellen unterscheidet. Die Versuchsergebnisse müssen daher gegebenenfalls an einer β -Zell-Primärkultur bestätigt werden.

Die in Kapitel 4.2.5 beschriebene Methode richtet sich nach Studien, die an Adipozyten, an glatten Muskelzellen und an Endothelzellen durchgeführt wurden. Die gewählten Inkubationszeiten und die eingesetzten Konzentrationen an ANG IV entsprechen den in den Studien gezeigten Maximaleffekten. Kerins et al. führten vor der eigentlichen Stimulation mit Angiotensin Peptiden eine Übernachtinkubation mit Captopril durch, um etwaige autokrine Angiotensineffekte zu minimieren^[196]. Darauf wird in den eigenen Untersuchungen verzichtet. Vorangegangene Studien verzichten auf Positivkontrollen, die in den eigenen Versuchen mit dem Zytokin IL-1 β erfolgen. IL-1 β führt in Adipozyten zu einer PAI-1-Expressionssteigerung^[188]. Dieser Effekt wird in glatten Muskelzellen durch eine Aktivierung des Expressionsfaktors NF κ B hervorgerufen^[159]. Esteban konnte zeigen, dass ANG IV in der glatten Muskulatur über Aktivierung von NF κ B die Expression proinflammatorischer Gene steigert, hierzu zählen neben PAI-1 auch MCP-1, TNF α , IL-6 und ICAM-1. Da in verschiedenen β -Zelllinien (MIN-6, RINm5f) eine Regulation der Genexpression durch NF κ B, z.T. induziert durch IL-1 β , beschrieben wird^[197, 198], wird IL-1 β als Positivkontrolle genutzt.

Literaturvergleich

Bislang konnte in glatter Muskulatur^[159], Endothelzellen^[186, 196] und in Adipozyten^[199] eine Stimulation der PAI-1-Genexpression durch Angiotensin Peptide beschrieben werden. Die ANG IV-Konzentrationen, die zur Stimulation verwendet werden, weichen jedoch bei den Gewebetypen voneinander ab. Am Endothel des proximalen Tubulus führt eine ANG IV-Konzentration von 10 nM zu einer 8 fachen Steigerung der PAI-1-Expression. Die maximale Stimulation wird nach 3 Stunden erreicht und fällt dann über mehrere Stunden ab^[186]. Diese Beobachtungen decken sich mit

Untersuchungen am Endothel der bovinen Aorta. Hier führt eine ANG IV-Konzentration von 10 nM innerhalb einer Inkubationszeit von 6 Stunden zu einer 4 fachen Expressionssteigerung der PAI-1 mRNA, wobei nach 3 Stunden der Maximaleffekt erreicht ist^[196].

In humanen Adipozyten hingegen werden Konzentrationen von 10^{-5} mol / L ANG IV benötigt, um nach einer Inkubationszeit von 48 h eine 4 fache Steigerung der PAI-1 mRNA zu induzieren^[199]. In beiden Gewebetypen zeigt auch ANG II in vergleichbaren Konzentrationen eine PAI-1-Expressionssteigerung. Am Endothel kann man den durch ANG IV-induzierten Effekt durch Divalinal antagonisieren. AT₁- und AT₂-Rezeptorantagonisten zeigen keinen Effekt auf die durch ANG IV-induzierte Wirkung, so dass deutlich wird, dass am Endothel die Steigerung der PAI-1-Expression über die Aktivierung des AT₄-Rezeptors moduliert wird^[196]. An Adipozyten scheint die durch ANG II und ANG IV ausgelöste PAI-1-Sekretionssteigerung über den AT₁-Rezeptor moduliert zu werden, da der AT₁-Rezeptorantagonist Candesartan sowohl die durch ANG II als auch die durch ANG IV-induzierte Expressionssteigerung inhibiert^[199].

An der glatten Muskulatur führen Konzentrationen von 10^{-9} mol/L ANG IV über einen Inkubationszeitraum von 6 h bereits zu einer deutlichen Steigerung der PAI-1-Sekretion, die mRNA-Expressionssteigerung ist somit nach 3 Stunden messbar. Die Vorinkubation mit Divalinal hebt die durch ANG IV-induzierte PAI-1-Sekretion wieder auf, so dass an der glatten Muskulatur die ANG IV Effekte über den AT₄-Rezeptor vermittelt werden^[159].

Aus der Literatur geht hervor, dass der AT₄-Rezeptor spezifisch durch ANG IV-Konzentrationen im nanomolaren Bereich aktiviert wird. Durch höhere Konzentrationen werden scheinbar AT-Rezeptoren unspezifisch stimuliert.

In einer Studie, die an 60 Patienten mit leichtem essentiellen Bluthochdruck durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass auch *in vivo* hohe ANG IV-Plasmaspiegel, die zwischen 5 - 35 pg / ml liegen, mit einem hohen PAI-1 Spiegel korrelieren^[15].

4.10.2 Western Blot

Der Western Blot ist ein etabliertes Verfahren, um Proteine in Zellkulturen oder Geweben nachzuweisen. Sie wurde 1979 von Renat et al. entwickelt und ist heute eine Standardmethode in Laboratorien.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (SDS-Page) der Proteine nach Größe und Ladung werden die Proteine im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Die Proteinauftrennung erfolgt unter reduzierenden Bedingungen (mit DTT), so dass Disulfidbrücken der Proteine aufgespalten werden. IRAP-Rezeptorhomodimere, die über Disulfidbrücken verknüpft sind, können so nicht nachgewiesen werden.

Die Vorrichtungen zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele, die Elektrophoresekammer und die Fotokammer zur Entwicklung der Blots, sind selbst konstruiert und entwickelt, so dass, verglichen mit kommerziellen Systemen und Entwicklungsapparaturen die Qualität der Blots ein wenig abfällt; jedoch leidet die wissenschaftliche Aussagekraft darunter nicht.

In der eigenen Arbeit wird auf eine Standardisierung der eingesetzten Proteinmenge verzichtet, die in der Regel mit standardisierten Albuminlösungen und anschließender photometrischer Vermessung durchgeführt wird. Durch den Einsatz einer konstanten Ausgangsmenge Zellmaterial kann die Probenvorbereitung standardisiert und so der qualitative Nachweis des AT₄-Rezeptors in der INS-1 Zelllinie erbracht werden.

Da der AT₄-Rezeptor in sehr großer Menge in der INS-1 Zelle exprimiert wird, ist eine weitere Aufkonzentrierung der Proben, z.B. durch eine Ultrazentrifugation bei 33.000 x g, wie sie beim Nachweis des AT₁-Rezeptors in der INS-1 Zelle durch Wensing et al. erfolgte, nicht nötig. In den eigenen Studien schließt sich nach der Homogenisierung der Zellen lediglich eine Ultrazentrifugation bei 13.000 x g an, um größere Membranbestandteile abzutrennen. Die Analytik erfolgt somit aus dem Zentrifugationsüberstand und nicht aus dem Zellpellet wie bei Wensing et al.

4.10.3 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Die Lokalisations- und Translokationsuntersuchungen der IRAP in der INS-1 Zelle werden mit einem Konstrukt aus dem zytoplasmatischen Teil der IRAP, der die Information für intrazelluläre Transportvorgänge und vesikuläre Speicherung trägt, und GFP als Reportereinheit durchgeführt. Dieses Konstrukt entspricht nicht der physiologischen IRAP und könnte, aufgrund eines höheren Molekulargewichts, vom natürlichen Translokationsverhalten abweichen. Es wurde jedoch von Taveré et al. erfolgreich in Translokationsstudien an Adipozyten eingesetzt^[192].

Die Expression GFP-markierter Proteine in einer Zellkultur, durch transiente und stabile Transfektion von Plasmid-DNA, bietet die Möglichkeit, in Echtzeit an lebenden

Zellen Strukturen unter physiologischen Bedingungen zu beobachten sowie Lokalisations- und Translokationsstudien, z.B. in einer Durchflusskammer, durchzuführen. Dies ist durch Färbemethoden mit Fluoreszenzfarbstoffen nicht möglich, da hier die Zellen zuvor mit Paraformaldehyd fixiert werden. Dies führt zu einer Denaturierung der Proteine und zum Verlust von spezifischen subzellulären Strukturmerkmalen.

Die Beobachtung von Transportvorgängen ist ebenfalls nur mit großem Aufwand möglich und setzt voraus, dass die zeitlichen Abläufe dieser Vorgänge in der Zelle bekannt sind.

Mit einem Auflösungsvermögen von 70 x 70 Pixeln können mit dem hier verwendeten CLSM der Firma Leica intrazelluläre Transportvorgänge beobachtet werden.

4.10.4 Radioaktive Methoden

4.10.4.1 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme

Die Methode eignet sich zur Testung von Substanzen, die die extrazelluläre Ca^{2+} -Aufnahme beeinflussen. Als problematisch erweist sich die Robustheit der Methode, da nur ca. 0,5 % der eingesetzten Menge $^{45}\text{Ca}^{2+}$ innerhalb der Inkubationszeit von 150 Sekunden von den Zellen aufgenommen wird. Geringe Mengen Radioaktivität, die unspezifisch an Plastikmaterial oder der Zelloberfläche anhaften, führen so leicht zu falsch hohen Messwerten. Waschschriffe und Spülvorgänge müssen daher sorgfältig eingehalten werden. Um diese Methodenungenauigkeit zu minimieren, wird jede Platte als Einzelversuch gewertet, auf der dann 4 abhängige Versuche zeilenweise pro Platte durchgeführt werden. Ausreißer werden, wie schon in den anderen Versuchen, durch die zwei σ -Regel entfernt.

Die Methodenkontrolle mit Nifedipin (Negativkontrolle) und Glibenclamid als auch eine 40 mM K^+ -Lösung (Positivkontrollen) zeigen, dass die Methode valide Ergebnisse liefert.

4.10.4.2 Insulinsekretion

Die quantitative Bestimmung des Insulingehalts in Plasma- und Sekretionsproben erfolgt durch einen Radioimmuno-Assay (Doppelantikörpermethode). Die Empfindlichkeit dieser Methode ermöglicht es, Insulinkonzentrationen durch eine Antigen-Antikörper Reaktion von bis zu 0,78 μU quantitativ zu bestimmen. Ähnliche

Bestimmungsgrenzen werden nur durch ELISA-Verfahren erreicht. Instrumentelle Verfahren, wie die CE oder HPLC, sind hinsichtlich Probendurchsatz und Arbeitsaufwand gegenüber der zeitaufwendigen Probenvorbereitung des RIA günstiger zu bewerten. Vergleicht man jedoch die Kosten pro Probe, ist der RIA kostengünstig und auch wenig störanfällig. Salze und BSA des Inkubationspuffers sowie Matrixbestandteile der Serumproben können die HPLC-Messung empfindlich stören.

4.10.5 IRAP-Assay

Die katalytische Aktivität der IRAP kann in diesem Enzymassay durch den Umsatz des synthetischen Substrates Leu-NA bestimmt werden. Da Leu-NA durch die Zellmembran diffundiert, wird immer die Gesamtaktivität der Zelle ermittelt, so dass nicht zwischen intrazellulär gespeicherter und an der Zelloberfläche exprimierter IRAP unterschieden werden kann.

Dieses Problem wurde von Takeuchi et al. aufgegriffen. Die Arbeitsgruppe entwickelte ein Fluoreszenzsubstrat, welches die Zellmembran nicht permeiert^[200], so dass z.B. die IRAP-Aktivität an der Zelloberfläche mit und ohne Insulinstimulus ermittelt werden kann. Dieses Substrat wäre sicherlich auch für die eigenen Versuche von Interesse gewesen, um z.B. die IRAP-Aktivität an der Oberfläche von INS-1 Zellen mit der an 3T3-L1 Adipozyten zu vergleichen.

Insgesamt ist dieser Assay jedoch eine robuste und reproduzierbare Methode, die kostengünstig und schnell Hinweise über die Affinität von ANG IV und Analoga am AT₄-Rezeptor liefert und das schnelle Screening von AT₄-Rezeptoragonisten ermöglicht, die z.B. im Rahmen der Alzheimer-Forschung entwickelt werden.

4.10.6 *In vivo*-Untersuchungen

Das zur Betäubung der Tiere eingesetzte Narkotikum Urethan zeigt einen unerwartet starken Eigeneffekt auf die Blutglukosespiegel und die Insulinplasmaspiegel, so dass die substanzspezifischen Effekte nach einem Glukosebolus im Vergleich zur Urethan Wirkung eher schwach ausgeprägt sind und die Blutglukosespiegel auch nach längerer Versuchsdauer nicht wieder in den physiologischen Bereich absinken. Da dies erst im Verlauf der Versuchreihe auffiel, wurde die Urethannarkose beibehalten. Für die Auswertung der Versuchdaten wurde dann eine unbehandelte Urethankontrollgruppe eingeführt.

Aisaka et al. konnten dem Mechanismus des Urethan-assoziierten Anstiegs des Blutglukosespiegels einer Steigerung des Adrenalinpiegels durch Aktivierung des zentralen und peripheren α_2 -adrenergen Systems zuordnen. So steigt der Blutglukosespiegel bei mit Yohimbin vorbehandelten Tieren, Tieren mit durchtrenntem Rückenmark und Tieren, bei denen die Nebenniere entfernt wurde, unter einer Urethannarkose kaum an^[201]. Zusätzlich scheint Urethan die Blutzucker-senkende Wirkung von Insulin aufzuheben^[202].

Sollten ähnliche *in vivo*-Versuche geplant werden, könnte eher auf das Narkosemittel Phenobarbital zurückgegriffen werden, das keine Effekte auf den Blutglukosespiegel aufweist^[201].

Die gewählte ANG IV-Dosis von 50 μg / kg KG wurde nach i.v. Gabe vom Tier gut vertragen. Sie liegt, verglichen mit den Studien in denen ANG IV zentral verabreicht wurde, im mittleren Konzentrationsbereich. In den Studien wurden Dosen zwischen 500 μg subkutan (s.c.)^[203] und 1 μg i.v. (intravenös)^[204] bzw. i.a. (intraatrial)^[153] verabreicht. Die physiologische ANG IV-Konzentration im Blut liegt bei ca. 10 pM^[15]. Im Striatum der Ratte wird eine physiologische ANG IV-Konzentration von 46 pM vermutet^[16].

4.10.7 HPLC-MS

Der *in vitro*-Abbau von Angiotensin Peptiden in Gegenwart von INS-1 Zellen wurde mittels HPLC-MS untersucht. Diese Methode gibt uns die Möglichkeit qualitativ sehr viele verschiedene Angiotensin-Abbauprodukte zu identifizieren, mitunter auch solche, die nur in sehr geringer Menge gebildet werden. Hier liegt der große Vorteil der Methode im Vergleich zur CE, bei der jeder unbekannte Peak durch Zuspiken des jeweiligen Peptids ermittelt werden muss.

Allerdings ist die Quantifizierung von Analyten mit der HPLC-MS um ein vielfaches aufwendiger. Die verwendeten Angiotensin Peptid-Konzentrationen sind mit 100 μM deutlich oberhalb des physiologischen Bereichs, dies könnte zur Absättigung der abbauenden Enzyme führen und zu einer Veränderung des Metabolitenspektrums, jedoch wurde auch in hochrangigen Publikationen mit diesen hohen Peptidkonzentrationen gearbeitet^[205, 206].

Wie auch bei der CE-Analytik erreichen wir bei der Quantifizierung mit einer Nachweisgrenze (Signal/Rausch-Verhältnis: 10:1) von $>1 \mu\text{M}$ ANG IV nicht den physiologischen, nanomolaren Konzentrationsbereich. Dies liegt zum einen an der

HPLC-MS Kopplung selbst, da über eine Interphase die Menge des Analyten, die in das MS übergeht, nicht reproduzierbar reduziert wird. Nachteilig ist außerdem die nicht reproduzierbare Elektrosprayionisierung (ESI) des Analyten sowie die Abhängigkeit des ESI-Vorgangs von der Probenmatrix, die in diesem Fall dem wässrigen, stark salzhaltigen Inkubationspuffer, der mit Proteinen, die während der Inkubationszeit in den Puffer sezerniert werden, kontaminiert ist, entspricht. Durch coeluiierende Matrixbestandteile nimmt die Ionisierbarkeit des Analyten ab. Diesen Effekt nennt man Ionensuppression. Er macht sich vor allem in niedrigen Konzentrationsbereichen bemerkbar und führt hier zum Verlust der Methodenlinearität. Zur Methodenoptimierung hätte man eine Entsalzung der Probe durchführen können, bei der es jedoch auch zu einer ungleichmäßigen Abreicherung der Angiotensin Peptide gekommen wäre. All diese Punkte machen den Einsatz eines internen Standards in der quantitativen HPLC-MS Analytik unverzichtbar, durch den die gewählte Methode valide und reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Allerdings wäre eine weitere Absenkung der Nachweisgrenze wünschenswert, um physiologische Veränderungen der Angiotensin Konzentration in Plasmaproben oder Zellhomogenisaten quantitativ nachweisen zu können. Die Messung der intrazellulären ANG II-Konzentration gelang Vivek et al. z.B. durch Kopplung von Immunpräzipitation mit der HPLC-MS Technik^[74].

5 Ergebnisse

5.1 Western Blot

Bislang wurde der AT₄-Rezeptor bzw. die IRAP im endo- oder exokrinen Pankreas nicht nachgewiesen oder näher untersucht. Weiland et al. konnten im IRAP-Assay aber erste Hinweise für den Rezeptor in der INS-1 Zelllinie zeigen. Die Funktion, die der AT₄-Rezeptor im endokrinen Pankreas bzw. in der β -Zelle einnimmt, ist unbekannt. Da aber die β -Zelle direkt mit dem Blutstrom in Verbindung steht, könnten IRAP-Substrate mit Wirkung auf die β -Zellfunktion durch IRAP prozessiert und in ihrer Wirkdauer beeinflusst werden.

Der Nachweis des Rezeptors in der INS-1 Zelllinie soll daher mittels SDS-Page und Western Blot erfolgen.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung konnte sowohl in INS-1 Zellen als auch in 3T3-L1 Zellen, die bekanntermaßen den Rezeptor exprimieren, im Western Blot eine Hauptbande mit einem extrapolierten Molekulargewicht von 165 kDa identifiziert werden (Abbildung 5-1). Die 165 kDa Bande ist mit der Beschriftung IRAP gekennzeichnet. Die weiteren Pfeile geben die Lage und das Molekulargewicht der Standard-Protein-Marker an.

Das extrapolierte Molekulargewicht stimmt mit den Literaturangaben zum Molekulargewicht des AT₄-Rezeptors / IRAP überein. Weitere im Blot sichtbare Banden stellen unspezifische Kreuzreaktionen des sekundären Antikörpers dar, der keine exakte Spezifität für den Primärantikörper besitzt.

Laut Literaturangaben ist IRAP in Adipozyten und Muskelzellen mit dem GLUT4-Transporter in Speichervesikeln kolokalisiert.

In INS-1 Zellen scheint diese Kolokalisation mit dem GLUT4-Transporter nicht gegeben zu sein, denn wie in Abbildung 5-2 zu sehen ist, wird der GLUT4-Transporter hier nicht exprimiert. Die Kontrolle an 3T3-L1 Adipozyten, die nachweislich den AT₄-Rezeptor exprimieren, zeigt eine Bande, die repräsentativ für den GLUT4-Transporter ist.

Die aufgezeigten Ergebnisse beweisen, dass INS-1 Zellen den AT₄-Rezeptor / IRAP exprimieren, aber die Proteinzusammensetzung der Speichervesikel in der INS-1 Zelle nicht mit den Untersuchungen an Fett- und Muskelzellen übereinstimmt.

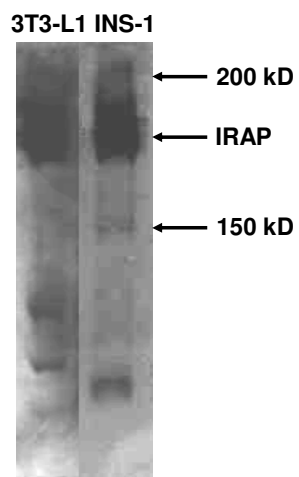


Abbildung 5-1: IRAP Western Blot using INS-1 und 3T3-L1 Zellen

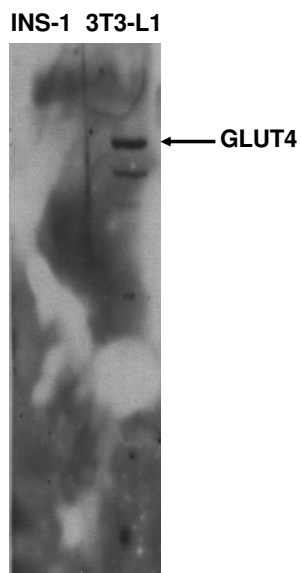


Abbildung 5-2: GLUT4 Western Blot using INS-1 und 3T3-L1 Zellen

5.2 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

5.2.1 Lokalisation von IRAP in der INS-1 Zelle

IRAP wird transient in die INS-1 Zelllinie transfiziert, um die intrazelluläre Lokalisation des Proteins durch konfokale Laserscanning Mikroskopie zu untersuchen. Werden in einer Overlaydarstellung die Transmissionsaufnahme und die Fluoreszenzaufnahme desselben Bereiches übereinander gelegt, sind intrazellulär gespeicherte AT₄-Rezeptor / IRAP-Vesikel im Bereich des ER nahe des Zellkerns zu erkennen (Abbildung 5-3). Es wird deutlich, dass IRAP in der INS-1 Zelle zu großen Teilen intrazellulär gespeichert wird. Diese Speicherung findet vor allem im Bereich um den Zellkern und des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt.

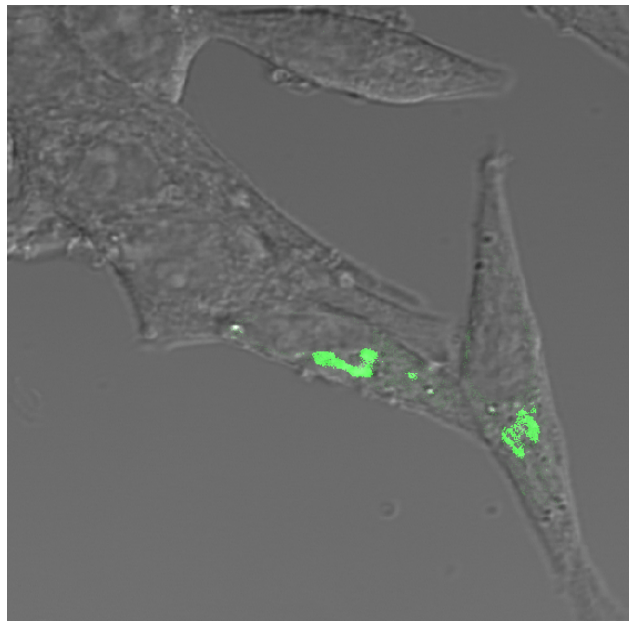


Abbildung 5-3: Overlaydarstellung aus Transmissions- und Fluoreszenzaufnahme einer transient transfizierten INS-1 Zellkultur

In der Overlaydarstellung sind intrazellulär gespeicherte IRAP Vesikel im Bereich des ER nahe des Zellkerns zu erkennen. Gezeigt wird eine repräsentative Aufnahme aus mehreren Versuchen.

Das exakte intrazelluläre Verteilungsmuster des AT₄-Rezeptors / IRAP wird in Abbildung 5-4 deutlich. Kleinere IRAP-haltige Vesikel lösen sich vom zentralen Speicherkompartiment ab und sind an die Zellmembran transloziert. Hier kommt es zur Verschmelzung der Vesikelmembran mit der Zellmembran und zur Einlagerung des AT₄-Rezeptors / IRAP an der Zelloberfläche. Die Aminopeptidasefunktion des Proteins ist nun in der Lage, extrazelluläre Substrate zu spalten. Bei der

mikroskopischen Betrachtung lebender, stabil transfizierter INS-1 Zellen im konfokalen System konnte eine Eigenbewegung dieser zytosolischen IRAP-Vesikel beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

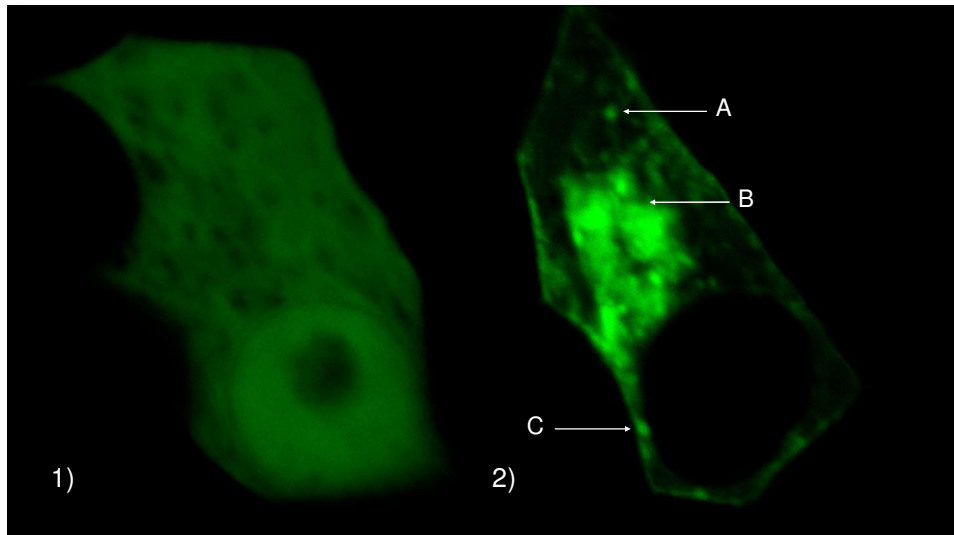


Abbildung 5-4: Transiente Transfektion von INS-1 Zellen mit den Plasmiden GFP pcDNA3 und IRAP-GFP pcDNA3

1) Das nach erfolgreicher Transfektion gebildete GFP reichert sich unspezifisch im Zytoplasma der INS-1 Zelle an. Im Bereich des Nukleolus, innerhalb des Zellkerns, kann keine Anreicherung beobachtet werden. 2) Die mit dem IRAP-GFP Plasmid transfizierte Zellkultur zeigt eine spezifische subzelluläre Verteilung. Freie Vesikel sind im Zytoplasma zu beobachten (A). Der größte Teil der intrazellulär gespeicherten IRAP findet sich in Bereichen des ER und nahe des Zellkerns (B). Im Bereich der Zellmembran finden sich Vesikel, die im Begriff sind, mit der Membran zu verschmelzen oder sich gerade von ihr zu lösen (C). Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen aus mehreren Experimenten.

5.2.2 Beeinflussung der vesikulären Speicherung

Es stellt sich die Frage, ob die vesikuläre Speicherung der IRAP-haltigen Vesikel in INS-1 Zellen beeinflusst werden kann. Insulin, Glibenclamid, Glukose und Bafilomycin A₁ wurden daraufhin untersucht. Außer Bafilomycin zeigt keine der genannten Substanzen einen Effekt auf die vesikuläre Speicherung von IRAP in INS-1 Zellen. Bafilomycin A₁, ein Inhibitor der vakuolären Protonen-Pumpe^[207] (V-Typ H⁺-ATPase), sorgt für den Anstieg des endosomalen pH-Werts^[208]. Der Anstieg des intravesikulären pH-Werts hebt die Speicherung dieser Vesikel im ER auf, und es kommt zu einer diffusen Verteilung der Vesikel im gesamten Zytoplasma (Abbildung 5-5). Die Retention im ER erfolgt pH-abhängig über zwei Dileucin-Motive in der zytoplasmatischen Domäne des Proteins. Über diese Bereiche kommt es zur Interaktion mit Proteinen des ER und somit zur Verankerung der IRAP-haltigen Vesikel in ihrem Speicherkompartiment.

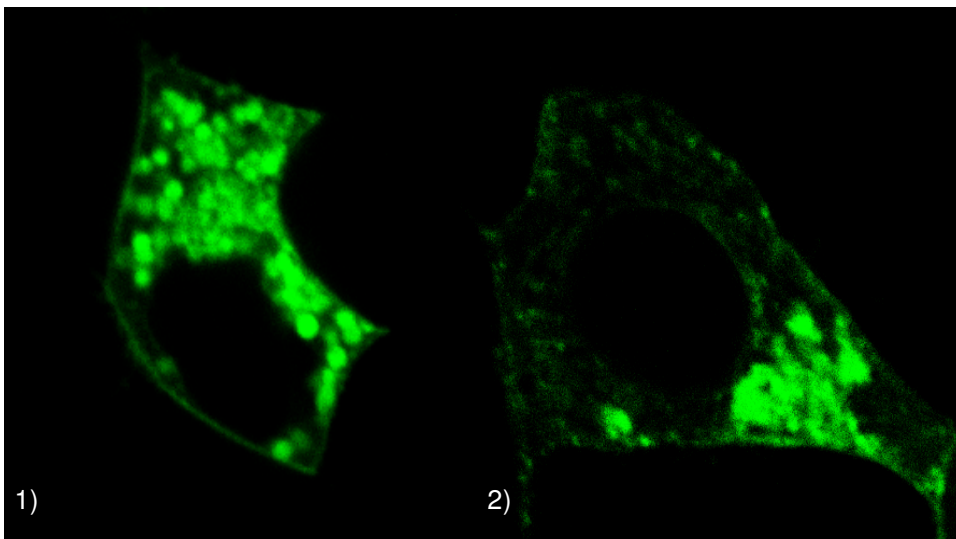


Abbildung 5-5: Fluoreszenzaufnahme stabil transfizierter INS-1 Zellen

1) INS 1 Zellen wurden stabil mit IRAP-GFP transfiziert und nach 5-tägiger Kultivierung mit 10 µM Bafilomycin A₁ über 4 Stunden inkubiert. Die vesikuläre Speicherung geht durch den Anstieg des endosomalen pH-Werts verloren. IRAP-haltige Vesikel verteilen sich diffus in der gesamten Zelle.
2) Kontrollversuch an stabil transfizierten INS-1 Zellen (4 Stunden inkubiert mit KRH-Puffer). Man erkennt eine physiologische Verteilung der IRAP-haltigen Vesikel in der INS-1 Zelle. Die Abbildung zeigt exemplarische Aufnahmen aus 5 Versuchen.

5.3 Radioaktive Methoden

5.3.1 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme

Bislang wurde in Studien hauptsächlich die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration durch ANG IV in verschiedenen Geweben gemessen. In dieser Arbeit ist es gelungen, einen Einfluss von ANG IV auf die Glukose-induzierte extrazelluläre Ca^{2+} -Aufnahme in INS-1 Zellen zu zeigen. Die so erzielten Ergebnisse sind besonders im Vergleich zu den Insulinsekretionsversuchen von Interesse und erlauben Rückschlüsse auf die Postrezeptorkopplung des AT_4 -Rezeptors in der β -Zelle.

Vorversuch

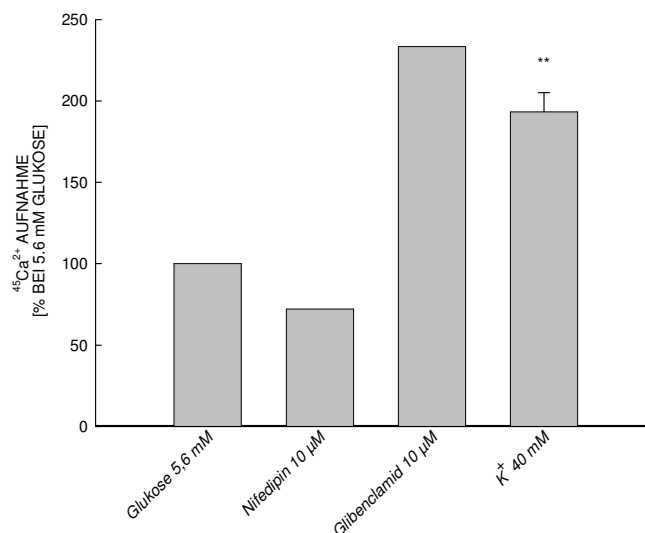


Abbildung 5-6: Methodenfunktionalität der $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmeversuche
 Effekt verschiedener Substanzen auf die 5,6 mM Glukose-induzierte Ca^{2+} -Aufnahme, (n = 2-19 + SEM, ** p < 0,01)

Die Kinetik der extrazellulären Ca^{2+} -Aufnahme wurde im Vorfeld von Töpfer et al.^[194] ermittelt. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 Minuten ist die Differenz zwischen der unspezifischen Ca^{2+} -Aufnahme bei einer Glukosekonzentration von 3,0 mM und einer spezifischen Ca^{2+} -Aufnahme bei einer Glukosekonzentration von 8,3 mM maximal. Substanzspezifische Unterschiede können nach einem Messzeitpunkt von 2,5 Minuten am deutlichsten dargestellt werden. Längere Inkubationszeiten bedingen einen höheren Anteil an unspezifischer Ca^{2+} -Aufnahme, die mit der Zeit linear anwächst.

Für die Aufnahmeversuche mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ wird jede Platte als Einzelversuch gewertet, auf der dann 4 abhängige Versuche zeilenweise pro Platte durchgeführt werden.

Die Validität der Methode wird mit Glibenclamid, einem Sulfonylharnstoff, und Nifedipin, einem Calciumkanalmodulator, überprüft (Positiv- und Negativkontrolle). Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-6 zu sehen. Nifedipin hemmt die Glukose-induzierte extrazelluläre Ca^{2+} -Aufnahme auf 72 %, bezogen auf einen 100 % Wert, der mit einer 5,6 mM Glukoselösung ermittelt wurde. Glibenclamid blockiert die Kaliumkanäle und induziert so die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (Positivkontrolle): Dies hat einen Ca^{2+} -Einstrom zur Folge. Als weitere Positivkontrolle dient eine 40 mM Kaliumchloridlösung.

5.3.1.1 ANG IV-induzierte Ca^{2+} -Aufnahme

ANG IV steigert in subnanomolaren Konzentrationen hoch signifikant die extrazelluläre Ca^{2+} -Aufnahme mit einem Maximum von 136 % bei 0,1 nM ANG IV (Abbildung 5-7). Verglichen mit den subnanomolaren ANG IV-Konzentrationen induzieren höhere ANG IV-Konzentrationen die Ca^{2+} -Aufnahme weniger stark, so dass sich insgesamt eine glockenförmige Dosis-Wirkungsbeziehung ergibt.

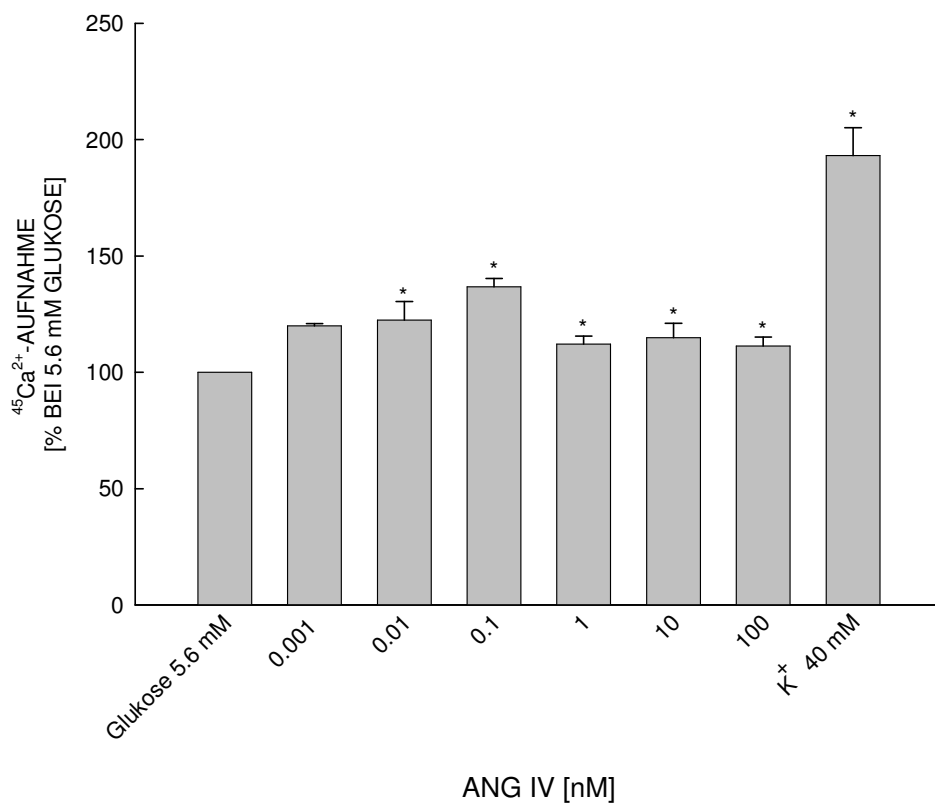


Abbildung 5-7: Wirkung von ANG IV auf die 5,6 mM Glukose-induzierte Ca^{2+} -Aufnahme
 n = 2-19 + SEM (unabhängige Versuche durchgeführt als Vierfachbestimmung),*:p < 0,01

Die ANG IV-induzierte Steigerung der Glukose-induzierten Ca^{2+} -Aufnahme kann durch den AT_4 -Rezeptorantagonisten Divalinal (10 nM) hochsignifikant von 140 % auf 111 % abgesenkt werden. Allerdings zeigt Divalinal in der verwendeten Konzentration eine leichte Steigerung der Ca^{2+} -Aufnahme auf 108 %. Dieses könnte bedeuten, dass es sich bei Divalinal eher um einen partiellen AT_4 -Rezeptoragonisten handelt (Abbildung 5-8).

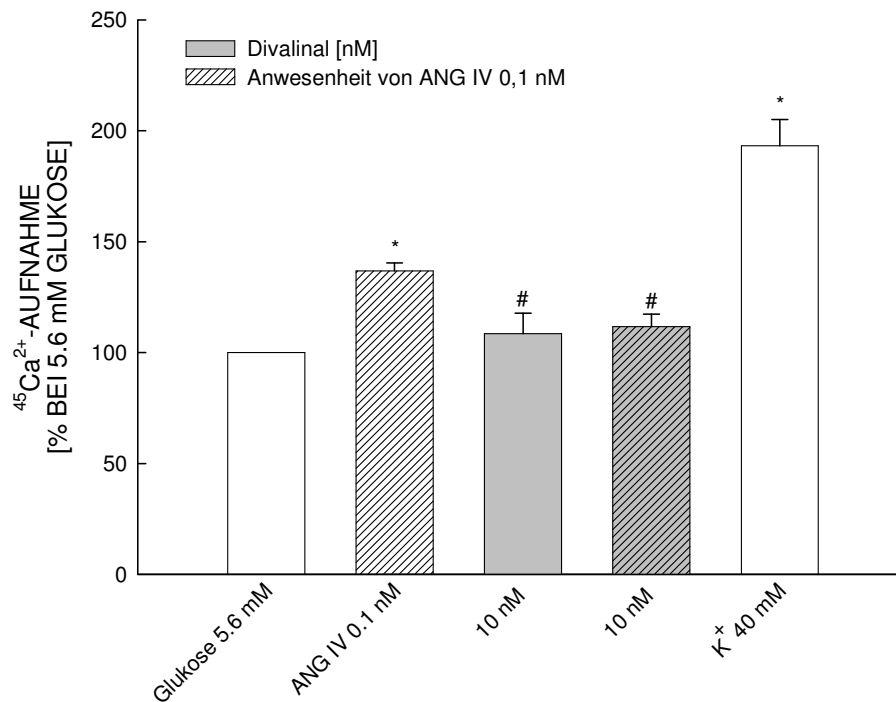


Abbildung 5-8: Wirkung von Divalinal auf die ANG IV-induzierte Steigerung der 5,6 mM Glukose-induzierten Ca^{2+} -Aufnahme

n = 3-19 (unabhängige Versuche durchgeführt als Vierfachbestimmung) + SEM, *: p < 0,01 (verglichen mit 5,6 mM Glukose), #: p < 0,01 (verglichen mit ANG IV 0,1 nM)

5.3.2 Insulinsekretion

Ob die über den AT₄-Rezeptor vermittelte Steigerung der Glukose-induzierten Ca²⁺-Aufnahme durch das Hexapeptid ANG IV Einfluss auf die Glukose-induzierte Insulinsekretion der INS-1 Zelle nimmt, soll in Insulinsekretionsversuchen nachgewiesen werden.

Die INS-1 Zellen werden über 90 Minuten bei 37°C mit KRH-Puffer, dem 5,6 mM Glukose und die Testsubstanzen zugesetzt werden, inkubiert und das in das umgebende Medium sezernierte Insulin wird mittels Radioimmunoassay quantitativ bestimmt. Die Kontrolle der Sekretionsfähigkeit erfolgt durch eine niedrige Glukosekonzentration (3,0 mM, Negativkontrolle) sowie dem Kaliumkanalmodulator Glibenclamid (10 µM, Positivkontrolle). Die Versuche, bei denen die Positivkontrolle keine stimulierende Wirkung auf die Insulinsekretion zeigt, gehen nicht mit in die Auswertung der Daten ein. Messwerte, die außerhalb eines 95% Konfidenzintervalls liegen, werden als Ausreißer eliminiert.

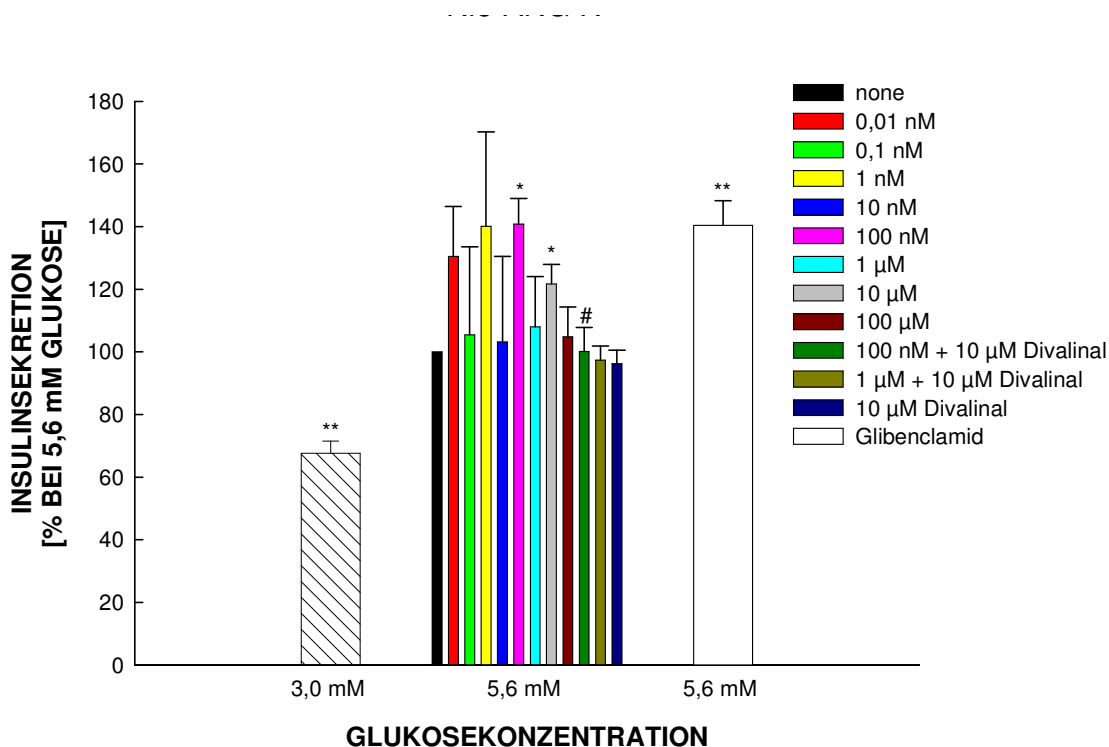


Abbildung 5-9: Effekt von Nle-ANG IV auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion von INS-1 Zellen

n = 3-11 MW + SEM, *: p = < 0,05, **: p < 0,01 (verglichen mit Glukose 5,6 mM), #: p = < 0,05 (verglichen mit 100 nM Nle-ANG IV)

Nle-ANG IV, ein hydrolysestabiles ANG IV-Analogon (0,01 nM bis 100 μ M), zeigt in bestimmten Konzentrationen eine signifikante Steigerung der Glukose-induzierten Insulinsekretion im Vergleich mit einer 5,6 mM Glukoselösung (siehe Abbildung 5-9). Vergleicht man Konzentrationen, die eine signifikante Steigerung der Ca^{2+} -Aufnahme induzieren mit den Konzentrationen, die im Sekretionsversuch eine signifikante Wirkung zeigen, liegt das Wirkmaximum von Nle-ANG IV im Sekretionsversuch drei

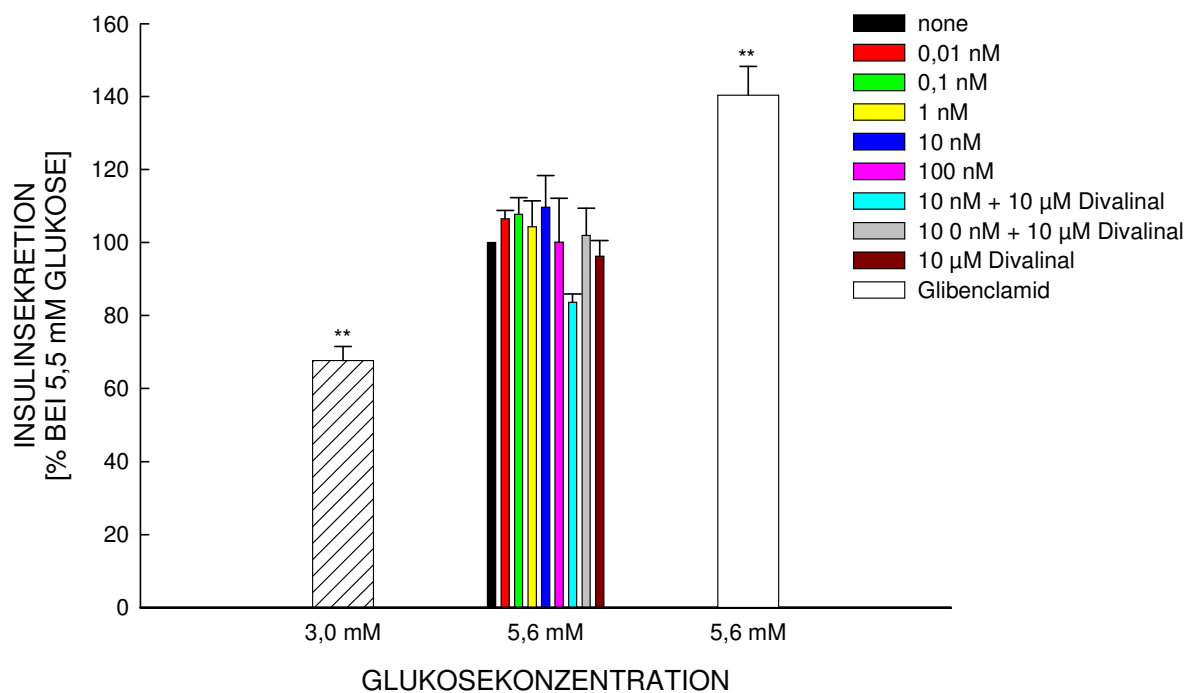


Abbildung 5-10: Effekt von ANG IV auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion von INS-1 Zellen

n = 3-11 MW + SEM, **: p < 0,01 (verglichen mit Glukose 5,6 mM)

Zehnerpotenzen höher. Dies könnte zum einen an unterschiedlichen Rezeptoraffinitäten der beiden Agonisten am AT_4 -Rezeptor, aber auch an der wesentlich längeren Inkubationszeit im Sekretionsversuch liegen.

Eine dosisabhängige Wirkung von Nle-ANG IV kann man aufgrund der starken SEM-Schwankungen nur vermuten. Insgesamt scheint sich jedoch, wie auch im Ca^{2+} -Assay, eine glockenförmige Dosis-Wirkungsbeziehung zu ergeben, die für Peptide nicht ungewöhnlich ist.

Der durch Nle-ANG IV (100 nM) hervorgerufene Effekt kann durch den AT_4 -Rezeptorantagonisten Divalinal (10 μ M) aufgehoben werden, so dass es sich um einen Rezeptor-spezifischen Effekt zu handeln scheint (siehe Abbildung 5-9).

Wie aus Abbildung 5-10 hervor geht, zeigt ANG IV selbst nur einen schwachen, nicht signifikanten Effekt auf die Insulinsekretion. Der maximale Effekt, der durch eine 10 nM ANG IV-Konzentration hervorgerufen wird, liegt bei 109 %, verglichen mit einer 5,6 mM Glukoselösung. Diese Konzentration ist vergleichbar mit der Konzentration Nle-ANG IV, die einen signifikanten Effekt auf die Insulinsekretion ausübt. Die glockenförmige Dosis-Wirkungsbeziehung scheint sich auch in Abbildung 5-10 zu bestätigen.

Die schwache Steigerung der Insulinsekretion durch 10 nM ANG IV kann durch Divalinal (10 μ M) antagonisiert werden.

ANG III, ein AT₁/AT₂- sowie AT₄-Rezeptoragonist, führt zu einer tendenziellen (nicht signifikanten) Hemmung der Insulinsekretion (Abbildung 5-11). Die Wirkung von ANG II auf die Insulinsekretion über den AT₁-Rezeptor zeigt in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. Der AT₂-Rezeptor konnte an der INS-1 Zelle nicht nachgewiesen werden.

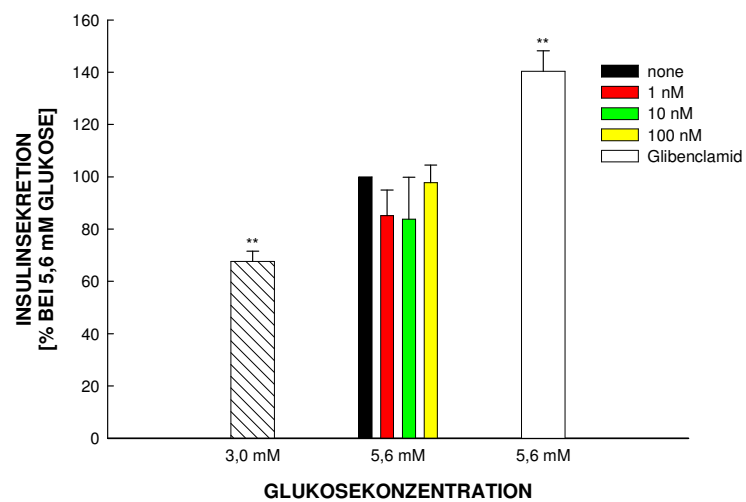


Abbildung 5-11: Effekt von ANG III auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion von INS-1 Zellen
n = 3-11 MW +SEM, **: p < 0,01 (verglichen mit Glukose 5,6 mM)

So kommt es bei der Aktivierung des AT₁- und des AT₄-Rezeptors vermutlich zu einer Wechselwirkung beider Rezeptorsysteme, die insgesamt eine Absenkung der Insulinsekretion zur Folge hat.

Nicht in Zusammenhang mit der Wirkung von Angiotensin Peptiden stehen die Ergebnisse aus Abbildung 5-12. Hier soll gezeigt werden, dass Bafilomycin A₁, welches in den Studien zur vesikulären Speicherung am CLSM verwendet wurde, den gerichteten Transport der Insulinvesikel mit anschließender Exozytose unterbindet. Dieses Ergebnis unterstreicht die CLSM-Ergebnisse bezüglich der Speicherung von IRAP-haltigen Vesikeln.

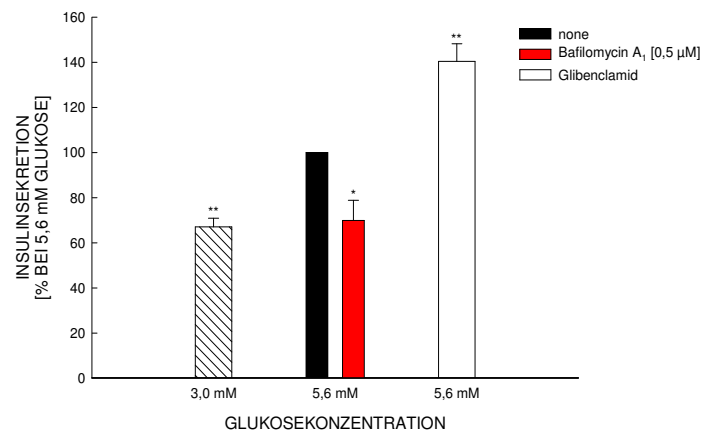


Abbildung 5-12: Effekt von Bafilomycin A₁ auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion von INS-1 Zellen
n = 3-11 MW +SEM, *: p < 0,05, **: p < 0,01 (verglichen mit Glukose 5,6 mM)

5.4 ANG IV-induzierte PAI-1-Expression

Vorversuche

In Vorversuchen wird die Methodenfunktionalität an ausdifferenzierten 3T3-L1 Adipozyten getestet. Im Fettgewebe ist die ANG IV-induzierte PAI-1-Expression nachgewiesen worden und kann hier im Zellversuch bestätigt werden.

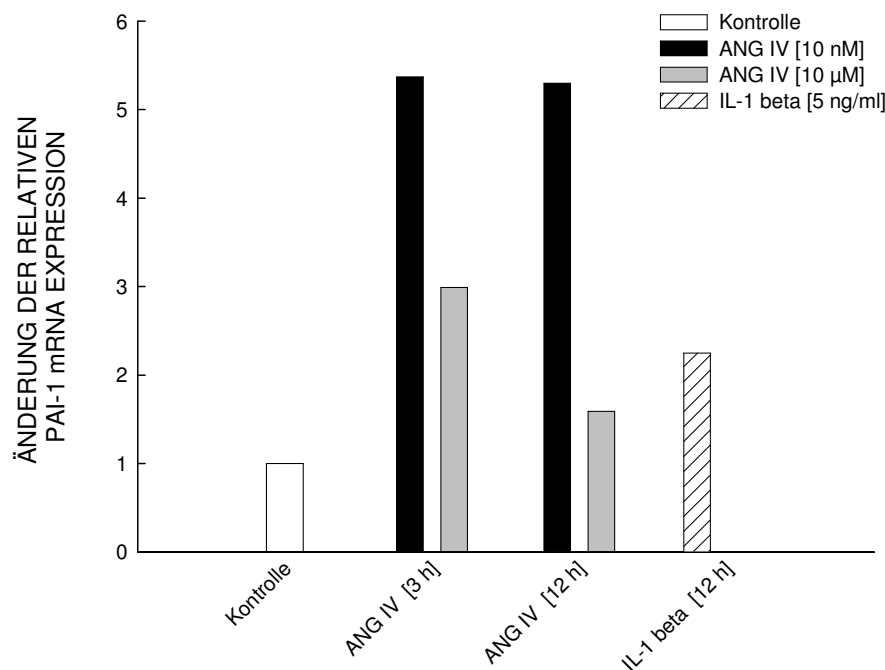


Abbildung 5-13: ANG IV-induzierte PAI-1 mRNA-Expression in 3T3-L1 Adipozyten, (n = 1)

In Abbildung 5-13 ist die Änderung der relativen PAI-1 mRNA-Expression unter verschiedenen Inkubationsbedingungen dargestellt. ANG IV, eingesetzt in einer Konzentration von 10 nM, stimuliert in 3T3-L1 Adipozyten die PAI-1 mRNA-Expression um den Faktor fünf. Diese Stimulation ist unabhängig von der Inkubationszeit, denn sowohl nach 3 Stunden als auch nach 12 Stunden Inkubation mit 10 nM ANG IV zeigt sich eine starke Expressionssteigerung. Eine höhere ANG IV-Konzentration zeigt einen deutlich geringeren Effekt auf die mRNA Expression. Eventuell spielt hier die Affinität von ANG IV an anderen AT-Rezeptoren aufgrund der eingesetzten hohen Konzentration eine Rolle. Die Positivkontrolle IL-1 β stimuliert die PAI-1 mRNA-Expression nach 12 stündiger Inkubation um den Faktor zwei.

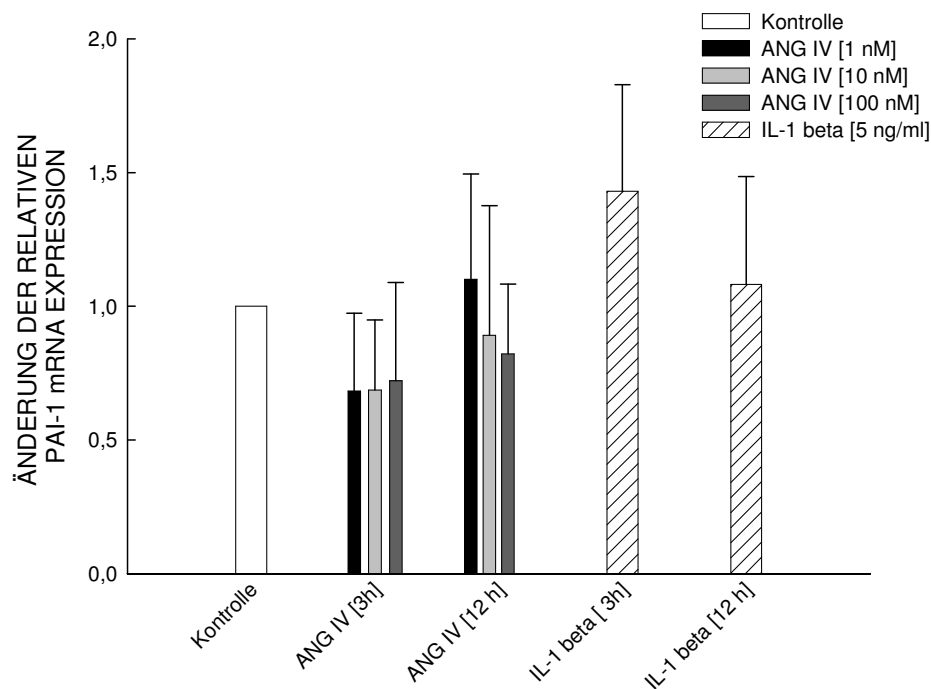
ANG IV-induzierte PAI-1 mRNA-Expression an INS-1 Zellen

Abbildung 5-14: Einfluss von ANG IV auf die PAI-1 mRNA-Expression an INS-1 Zellen, (n = 3 + SEM)

Wie aus der Abbildung 5-14 hervorgeht, zeigt ANG IV im eingesetzten Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die PAI-1 mRNA-Bildung. Die Ergebnisse nach einer 3-stündigen Inkubation der Zellen deuten eher auf eine Hemmung der PAI-1 mRNA-Expression durch ANG IV hin. Möglicherweise ist die PAI-1 mRNA-Expression in der INS-1 Zelle nicht über den NF κ B-Weg vermittelt. Dafür sprechen auch die schwachen Effekte der Positivkontrolle IL-1 β . Eine generelle Expression von PAI-1 mRNA in der INS-1 Zelllinie konnte jedoch nachgewiesen werden. Wie diese Expression reguliert wird und ob die mRNA auch in Protein translatiert wird bleibt offen.

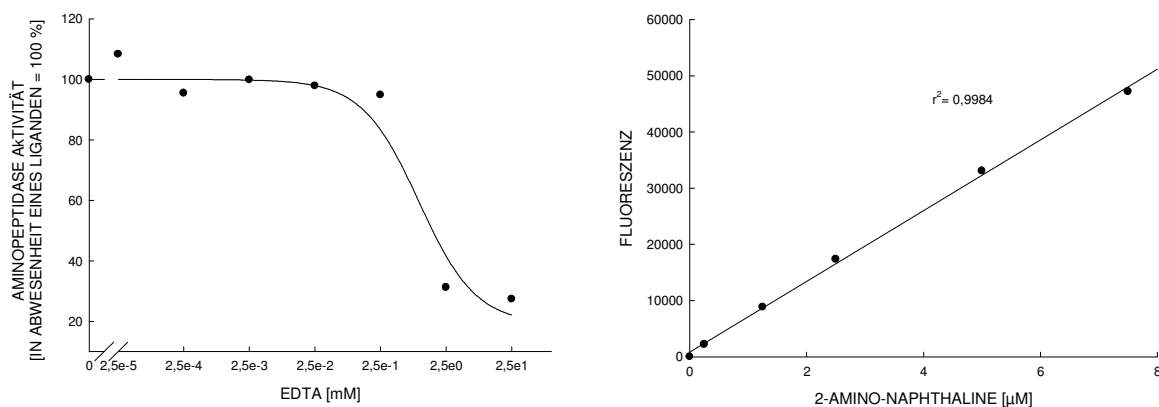
5.5 Beeinflussung der IRAP-Aktivität

5.5.1 Vorversuche

Die Enzymaktivität der IRAP kann mit dem synthetischen Aminopeptidase-Substrat Leucyl- β -Naphthylamid (Leu-NA) an der INS-1 Zelllinie untersucht werden. ANG IV hemmt spezifisch die Zink-abhängige Aminopeptidase IRAP, so dass der Umsatz des synthetischen Substrats Leu-NA gesenkt wird. Um einen Abbau von Leu-NA durch unspezifische Aminopeptidasen zu minimieren, wird bei Substratkonzentrationen im Bereich der Michaelis-Menten Konstante (K_M) gearbeitet. Diese liegt laut Literaturangaben für IRAP bei $25 \mu\text{M}$ ^[94] und wurde durch Weiland et al. bestätigt^[156].

Die Linearität der Methode ist, wie in Abbildung 5-15 zu sehen, anhand einer Kalibration mit dem Fluoreszenzprodukt 2-Amino-Naphthalin nachgewiesen worden. In jedem Versuch wird EDTA in einer Konzentration von 25 mM als Positivkontrolle eingesetzt. EDTA hemmt durch Chelatisierung von Zink-Ionen unspezifisch die IRAP-Enzymaktivität. Da Leu-NA in die Zelle penetrieren kann, entspricht der gemessene Stoffumsatz nicht nur dem membranständigen Anteil der IRAP, sondern der IRAP-Gesamtkonzentration in der Zelle.

Abbildung 5-15: Vorversuche zur Bestimmung der IRAP-Aktivität



a) Inhibition der Aminopeptidaseaktivität aufgrund der Zink Chelatisierung durch EDTA, (n = 2, 8 Replikate)

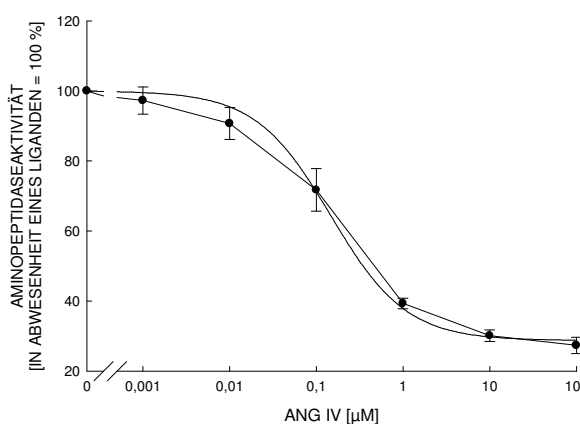
b) Kalibriergerade des Produktes 2-Amino-Naphthalin (Ex. 330 nm, Em. 390 nm), (n = 1, 8 Replikate)

5.5.2 IC₅₀-Bestimmung der Angiotensin Peptide

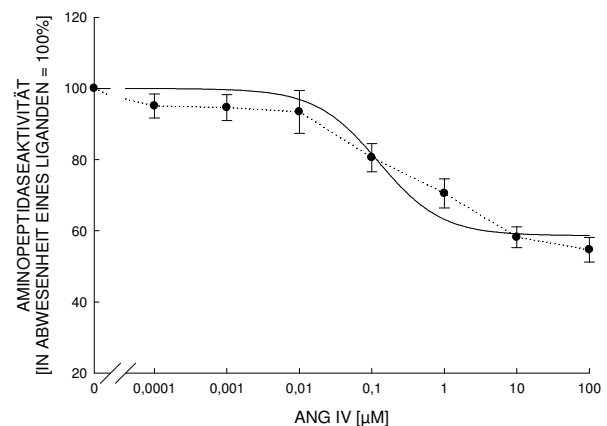
Der Enzymassay zeigt, dass ANG IV die katalytische Funktion der IRAP in INS-1 Zellen über eine Interaktion am AT₄-Rezeptor hemmt. Somit bestätigen sich die von Weiland et al. an 3T3-L1 Adipozyten gezeigten Ergebnisse^[156]. Das Ausmaß der Hemmung unterscheidet sich allerdings in den beiden Zellkulturen. Die Enzymaktivität in 3T3-L1 Adipozyten wird durch ANG IV auf eine Restaktivität von ca. 30 % gesenkt (siehe Abbildung 5-16). An INS-1 Zellen zeigt ANG IV nur eine Enzymhemmung auf ca. 60 % Restaktivität. Dies könnte mit einer unterschiedlichen intrazellulären Verteilung der IRAP in INS-1 Zellen und 3T3-L1 Adipozyten zusammenhängen. In 3T3-L1 Adipozyten ist die IRAP vermehrt an der Zelloberfläche exprimiert, wohingegen in INS-1 Zellen die IRAP zu einem großen Teil intrazellulär gespeichert vorliegt. Da Leu-NA sowohl für zellmembranständige und intrazellulär gespeicherte IRAP zugänglich ist, kann ANG IV, selbst weniger gut membrangängig, in erster Linie nur die katalytische Aktivität des membranständigen Anteils hemmen. Eine weitere Erklärung wäre das Vorkommen von IRAP-Subtypen, deren katalytische Funktion mehr oder weniger stark durch ANG IV-Interaktion am AT₄-Rezeptor gehemmt werden kann.

Der IC₅₀-Wert der ANG IV-induzierten Hemmung ist bei INS-1 und 3T3-L1 Zellen vergleichbar und liegt bei ca. 160 bzw. 200 nM.

Abbildung 5-16: Inhibition der Aminopeptidaseaktivität durch ANG IV an 3T3-L1 und INS-1 Zellen



a) Inhibierung des IRAP-abhängigen Substratumsatzes durch ANG IV an 3T3-L1 Adipozyten (n = 4 ± SEM, Quadruplikate)



b) Inhibierung des IRAP-abhängigen Substratumsatzes durch ANG IV an INS-1 Zellen (n = 8 ± SEM, Quadruplikate)

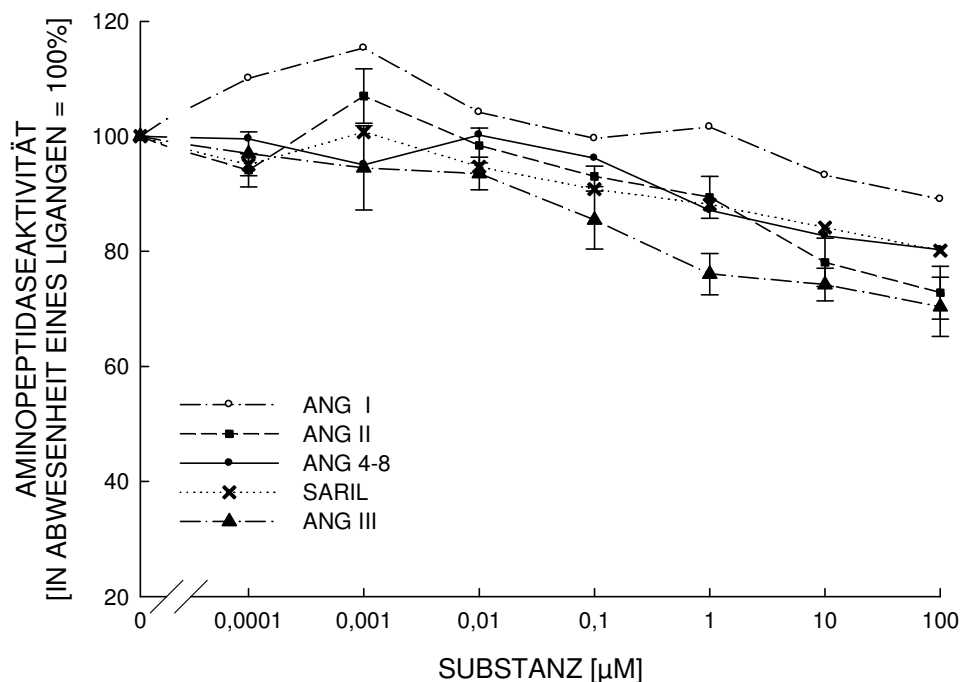


Abbildung 5-17: Inhibition der Aminopeptidaseaktivität durch Angiotensin Peptide

Die Abbildung zeigt die Inhibition des IRAP-abhängigen Stoffumsatzes durch verschiedene Angiotensin Peptide ($n = 2-6 \pm \text{SEM}$, Quadruplikate)

Wie aus der Abbildung 5-18 hervorgeht, hemmt neben ANG IV auch ANG III die IRAP Aktivität im nanomolaren Bereich. Allerdings ist die Hemmung durch ANG III nur schwach ausgeprägt. ANG I, ANG II und ANG 4-8 als Edukte und Produkte des Angio-

Substanz	IC ₅₀	r ²	n
ANG I	-	-	4
ANG II	1,5 µM	0,94	5
ANG III (1-site Model)	105 nM	0,986	6
ANG III (2-site Model)	0,01 nM 162 nM	0,996	6
ANG IV	214 nM	0,98	8
ANG IV (3T3-L1)	166 nM	0,99	4
ANG 4-8	585 nM	0,94	2
Sarile	-	-	2

Abbildung 5-18: IC₅₀-Werte der Angiotensin Peptide im IRAP-Assay

tensinmetabolismus haben einen noch geringeren Effekt auf die Aminopeptidasefunktion. Die schwache Aktivität dieser Peptide könnte durch unter

der Inkubation entstandenes ANG IV bedingt sein. Sarile, ein ANG II-Analogen, hemmt die katalytische Funktion der IRAP unspezifisch.

5.5.3 ANG III als AT₄-Agonist

Der Kurvenverlauf der ANG III-induzierten Hemmung der IRAP-Aktivität zeigt im nanomolaren Bereich eine schlechte Regression (Abbildung 5-19). Weiland et al. vermuten daher eine zweite mögliche Bindungsstelle für ANG III im subnanomolaren Bereich, die sie in 3T3-L1 Adipozyten rechnerisch darstellen können.

Berechnet man die ANG III Messwerte, die an INS-1 Zellen im IRAP-Assay ermittelt wurden, als Model mit zwei Bindungsstellen, ergibt sich eine leichte Verbesserung der Regression ($r^2 = 0,986$ vs. $0,996$), verglichen mit einem Model mit nur einer Bindungsstelle. Allerdings führt diese verbesserte Regression eines Models mit zwei Bindungsstellen nicht zu einer Verbesserung des p-Werts gegenüber dem Model mit einer Bindungsstelle ($r^2 = 0,0017$ vs. $0,0001$), so dass die zweite Bindungsstelle für ANG III in INS-1 Zellen weiterhin nur vermutet werden kann. Für ANG IV ergibt eine Regression mit zwei Wendepunkten keinen Vorteil.

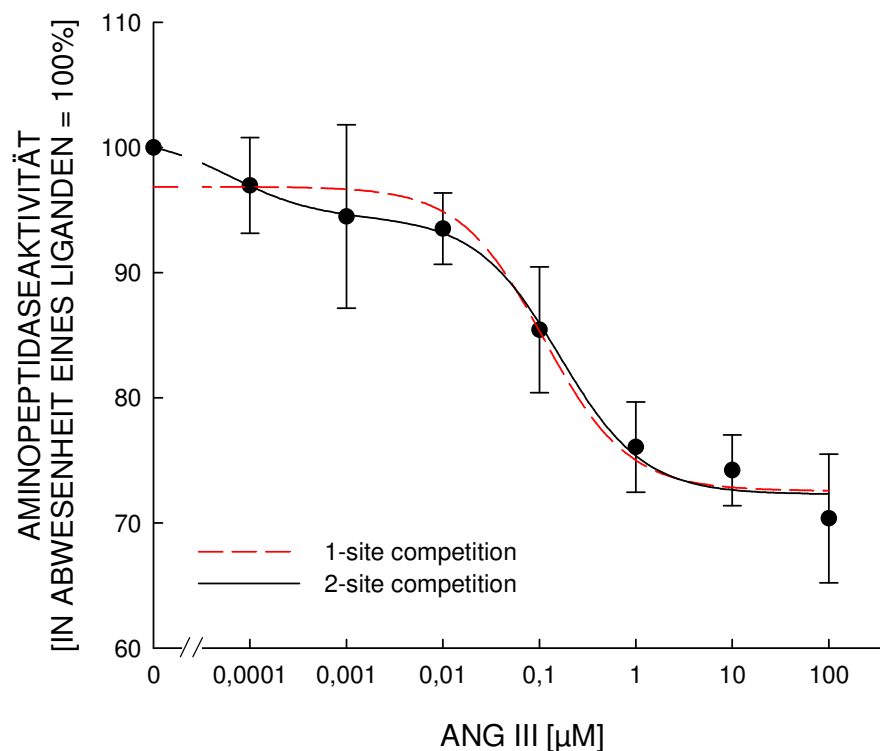


Abbildung 5-19: Regression der Messwerte von ANG III mit einer und zwei Bindungsstellen, (n = 6 \pm SEM, Quadruplikate)

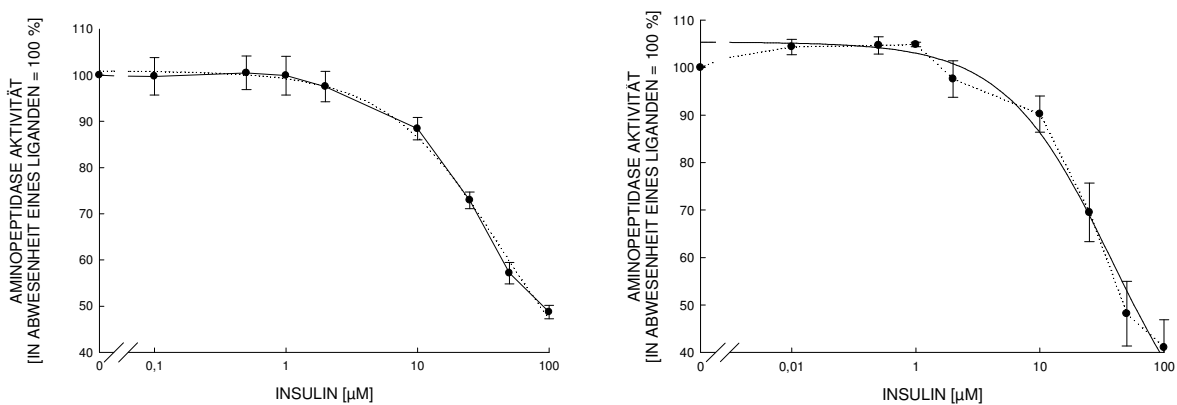
5.5.4 Enzymhemmung durch IRAP-Substrate

Neben Oxytocin und Vasopressin sind wenige Substrate der IRAP bekannt. Im Folgenden soll die Wirkung von Insulin, als Hormon der β -Zelle, auf die IRAP-Aktivität an INS-1 Zellen beschrieben werden.

In Abbildung 5-20 wird deutlich, dass Insulin in 3T3-L1- als auch in INS-1 Zellen die IRAP-Aktivität auf ca. 50 % Restaktivität senkt. Die Hemmwirkung auf die katalytische Aktivität tritt allerdings erst in relativ hohen Konzentrationen auf, so dass sich an 3T3-L1 Adipozyten eine berechnete IC_{50} von 42 μ M, an INS-1 Zellen von 38 μ M ergibt. Diese hohen IC_{50} -Werte sind aber nicht weiter erstaunlich, da auch die IC_{50} -Werte der bekannten *in vitro*-Substrate im mikromolaren Bereich liegen.

Insulin hemmt somit die IRAP-Aktivität; ob es sich jedoch auch um ein Substrat der IRAP handelt, kann in diesem Assay nicht abschließend geklärt werden.

Abbildung 5-20: Hemmung der IRAP-Aktivität durch Insulin an 3T3-L1 Adipozyten und INS-1 Zellen



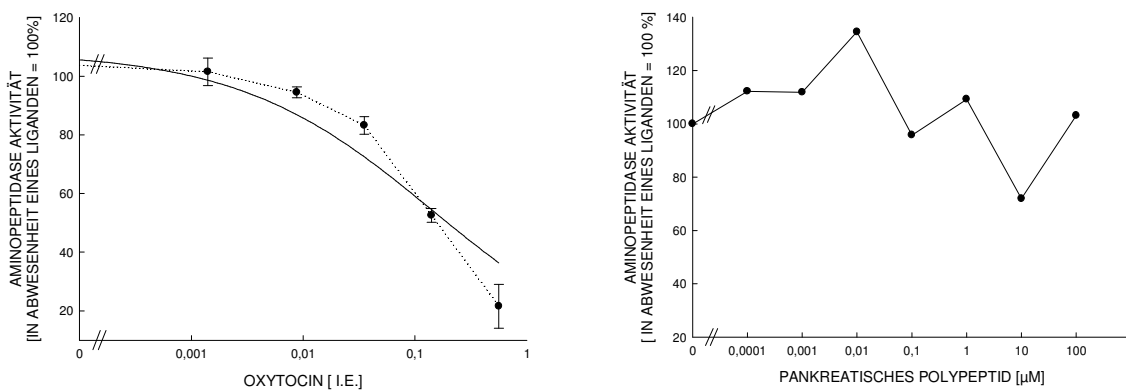
a) Insulin-induzierte Hemmung der IRAP-Aktivität an 3T3-L1 Adipozyten; IC_{50} : 42 μ M; $r^2 = 0,998$ ($n = 4 \pm$ SEM, Quadruplikate)

b) Insulin-induzierte Hemmung der IRAP-Aktivität an INS-1 Zellen; IC_{50} : 38 μ M; $r^2 = 0,994$ ($n = 5 \pm$ SEM, Quadruplikate)

Das IRAP-Substrat Oxytocin und das Pankreatische Polypeptid (PP) wurden ebenfalls auf ihre Wirkung im IRAP-Assay untersucht (Abbildung 5-21). Die Ergebnisse zeigen, dass auch *in vitro*-Substrate der IRAP in diesem Assay untersucht werden können und Insulin gegebenenfalls ein weiteres *in vitro*-Substrat der IRAP darstellen könnte.

Das IRAP-Substrat Oxytocin zeigt an INS-1 Zellen eine Hemmung der IRAP-Aktivität. Allerdings ist die maximale Enzymhemmung bei einer Konzentration von 0,75 I.E. noch nicht voll erreicht und dadurch der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve nicht ganz deutlich. Methodisch konnten aber keine höheren Oxytocin-Konzentrationen eingesetzt werden, da mit dem Oxytocin-Fertigpräparat Syntocinon® gearbeitet wurde. Aus der Abbildung 5-21 geht jedoch hervor, dass an der INS-1 Zelle durch IRAP der N-terminale Abbau von Oxytocin reguliert wird. Dies ist auch sinnvoll, da Oxytocin einen stimulierenden Effekt auf die Sekretion der β -Zelle ausübt^[209]. Das Pankreatische Polypeptid hat demgegenüber keinen Einfluss auf die IRAP-Aktivität.

Abbildung 5-21: Hemmung der IRAP-Aktivität durch Oxytocin und PP an 3T3-L1 Adipozyten und INS-1 Zellen



a) Oxytocin-induzierte Hemmung der IRAP-Aktivität an INS-1 Zellen; IC_{50} : 0,466 I.E.; $r^2 = 0,94$ ($n = 3 \pm \text{SEM}$, Quadruplikate)

b) Das PP zeigt keinen Effekt auf die IRAP-Aktivität an INS-1 Zellen, ($n = 1$, Quadruplikate)

5.6 *In vivo*-Versuche mit ANG IV (Blutglukose und Plasmainsulin)

Um die Wirkung von ANG IV auf den Blutglukose- und den Plasmainsulinspiegel am Ganztier zu untersuchen, wird Urethan-narkotisierten Wistar-Ratten (1,8-2 g / kg KG) eine ANG IV-Bolusdosis von 50 µg / kg KG zeitgleich mit einer intraperitonealen Glukosebolusgabe (200 mg / kg KG) über einen Katheter in die Vena jugularis intravenös appliziert. Eine Kontrollgruppe wird mit NaCl-Lösung behandelt. Die retrobulbären Blutentnahmen erfolgen nach 5, 15, 45, 90 und 180 Minuten. Aus dem gewonnenen Blut werden die Blutglukose- und Plasmainsulinwerte bestimmt.

5.6.1 Blutglukosebestimmung

In der Literatur wird wiederholt die Wirkung von ANG IV auf die Glukosehomöostase diskutiert, jedoch fehlen *in vivo*-Versuche mit ANG IV hinsichtlich der Wirkung des Peptids auf den Glukosestoffwechsel.

Ein direkter Zusammenhang besteht zwischen dem Blutglukosespiegel und der Insulin-induzierten Translokation der IRAP an die Zelloberfläche (siehe Abbildung 1-12). Da ANG IV die katalytische Funktion der an der Zelloberfläche lokalisierten IRAP hemmt, ist der Abbau physiologischer Substrate gemindert bzw. die Wirkung dieser Substrate verlängert. Eines dieser Substrate könnte, wie im IRAP-Assay gezeigt, Insulin sein. Falls sich diese Theorie bestätigt, würde die Insulinwirkung unter ANG IV-Bolusgabe verlängert und die Absenkung des Blutglukosespiegels im Vergleich mit der Kontrollgruppe stärker ausfallen.

Vorversuch

Im Verlauf der Versuchsreihe stellte sich heraus, dass das Narkotikum Urethan eine Wirkung auf den Blutglukosespiegel der Ratte (Steigerung) aufweist. Um diesen Effekt darzustellen, wurde vor der Urethannarkose der basale Blutglukosespiegel nach einer kurzen Halothannarkose ermittelt. Aus Abbildung 5-22 geht hervor, dass schon im Verlauf der Narkotisierung der Versuchstiere mit Urethan, die ca. 1 Stunde benötigt, der Blutglukosespiegel um ca. 50 mg / dL ansteigt und zum Ende des Versuchs Werte von über 220 mg / dL erreicht. Der Anstieg zu Beginn der Urethannarkose könnte ein Mischeffekt aus Urethanwirkung und Handlingstress bei den Versuchstieren sein. Im Verlauf des eigentlichen Versuchs ist der Anstieg ausschließlich durch Urethaneffekte zu erklären.

Für die Auswertung der Versuchsergebnisse bedeutet dies, dass die Urethan-Eigenwirkung auf den Blutglukosespiegel von den spezifischen Effekten der Testsubstanzen subtrahiert wird, so dass die reinen Effekte der Testsubstanzen zu erkennen sind.

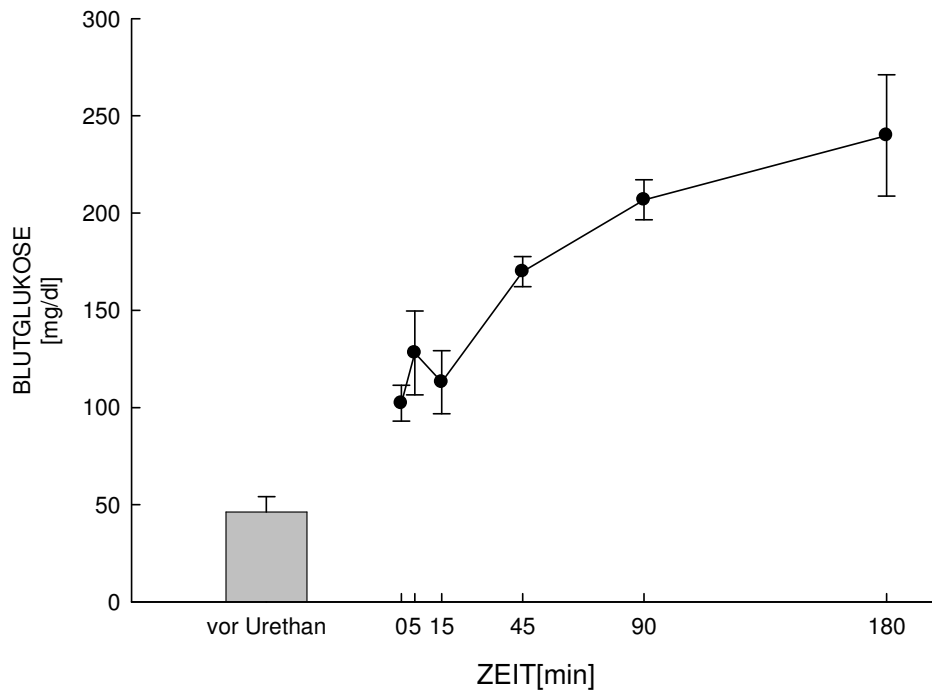


Abbildung 5-22: Urethan-induzierter Blutglukoseanstieg bei Wistar-Ratten

Die Versuchstiere werden mit Halothan betäubt und es wird retrobulbär Blut entnommen (vor Urethan-Wert). Die weiteren Blutentnahmen werden nach erfolgter Urethannarkose ohne Glukosebolusgabe analog der beschriebenen Messzeitpunkte durchgeführt. (n = 3 ± SEM)

5.6.2 Effekt von ANG IV auf den Blutglukosespiegel der Ratte

Wie aus der Abbildung 5-23 hervorgeht, zeigen ANG IV-behandelte Tiere über einen Beobachtungszeitraum von 90 Minuten einen weniger starken Anstieg der Blutglukosewerte als die mit Kochsalzlösung behandelte Kontrollgruppe. Die berechneten Kurvenverläufe unterscheiden sich mittels F-Test Analyse signifikant voneinander ($p = 0,012$).

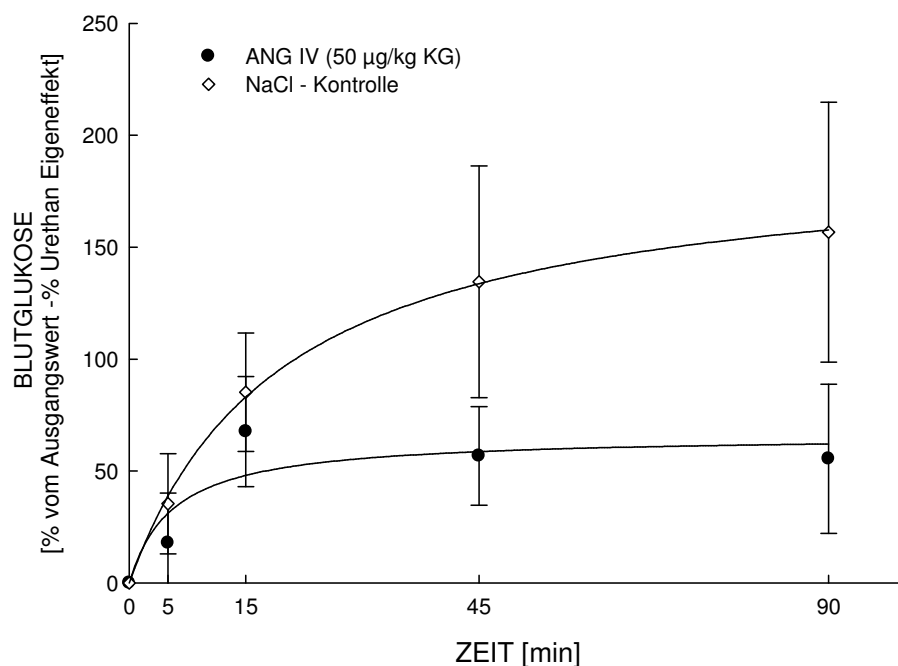


Abbildung 5-23: ANG IV-Effekt auf den Blutglukosespiegel nach GTT

Nach einem Glukosebolus (i.p.) kommt es nach ANG IV-Gabe zu einem weniger starken Anstieg des Blutglukosespiegels im Vergleich zu den NaCl-behandelten Kontrolltieren. Die Regression beträgt für die ANG IV-Gruppe $r^2 = 0,90$; für die Kontrollgruppe $r^2 = 0,99$. ($n = 5 \pm \text{SEM}$, $p = 0,012$)

5.6.3 Plasmainsulinbestimmung

Die intravenöse ANG IV-Gabe führt, wie gezeigt, zu einer Abnahme des Blutglukoseanstiegs der Ratte. Ob dieser Effekt durch einen erhöhten Plasmainsulinspiegel, der durch die Steigerung der pankreatischen Insulinsekretion oder die Hemmung des Insulinabbaus bedingt sein kann, sollen die folgenden Versuche zeigen. Vorab wird auch bei der Plasmainsulinbestimmung der Einfluss des Narkotikums Urethan auf die basale Insulinsekretion ermittelt.

Vorversuch

Der Anstieg der Blutglukosewerte durch Urethan korreliert mit der in Abbildung 5-24 gezeigten Absenkung der Plasmainsulinwerte während des Versuchs. Zunächst steigt der Plasmainsulinwert zu Beginn der Urethannarkose leicht an; dies könnte durch den Stress, der beim Handling der Ratte entsteht, verursacht sein. Im Verlauf des Versuchs sinkt der Insulinspiegel dann bis auf Werte um $6 \mu\text{U}$, um dann nach 180 Minuten wieder leicht anzusteigen. Urethan scheint also einen direkten Effekt auf die Funktionalität der β -Zelle, bzw. auf die basale Insulinsekretion zu haben.

Für die Auswertung der Versuchsergebnisse bedeutet dies, dass die prozentuale Urethan-Eigenwirkung auf den Plasmainsulinspiegel von den prozentualen, spezifischen Effekten der Testsubstanzen subtrahiert wird, so dass die reinen Effekte der Testsubstanzen zu erkennen sind.

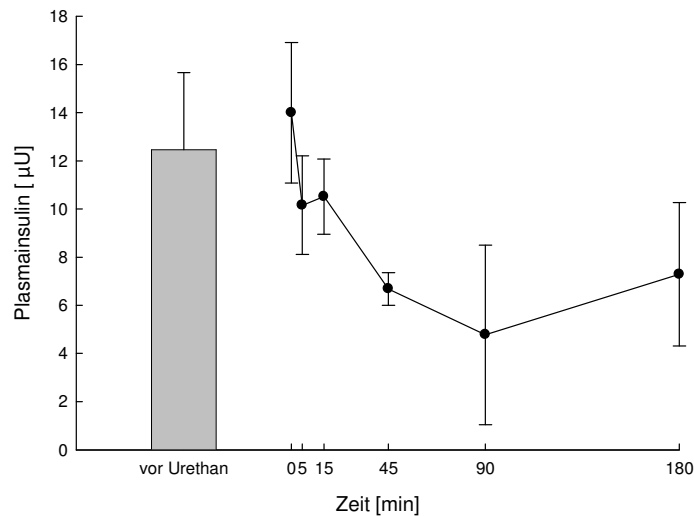


Abbildung 5-24: Urethan-induzierte Änderung des Plasmainsulinspiegels

Die Versuchstiere werden mit Halothan betäubt und es wird retrobulbär Blut entnommen (vor dem Urethan-Wert). Die weiteren Blutentnahmen erfolgen nach der Urethannarkose ohne Glukosebolusgabe analog der beschriebenen Messzeitpunkte, ($n = 3 \pm \text{SEM}$).

5.6.4 Effekt von ANG IV auf die Plasmainsulinkonzentration

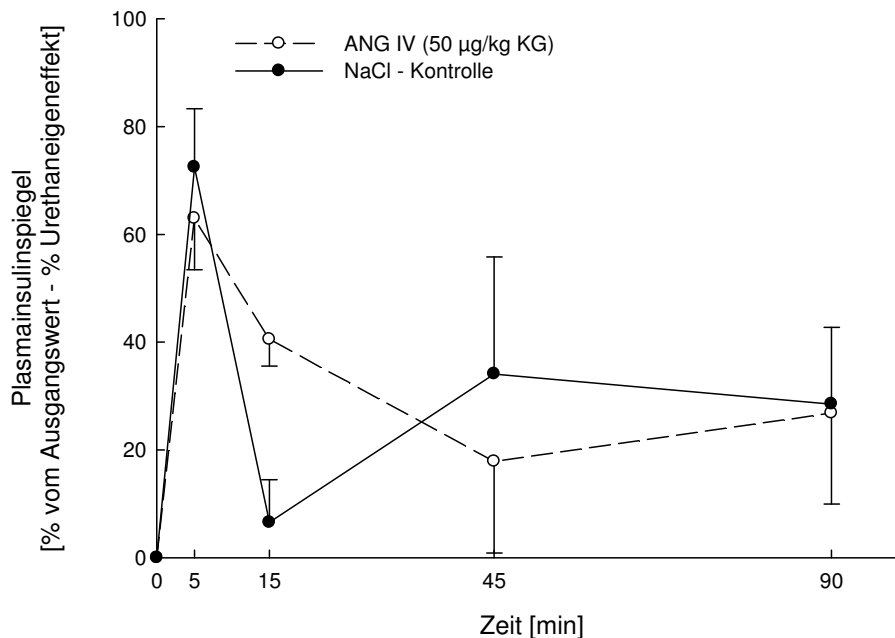


Abbildung 5-25: ANG IV-Effekt auf den Plasmainsulinspiegel nach GTT

Nach einer Glukosebolusgabe kommt es initial zu einem Anstieg der pankreatischen Insulinsekretion in ANG IV- und NaCl-behandelten Tieren. Die Absenkung des Insulinspiegels ist in der ANG IV-behandelten Gruppe allerdings verlangsamt. Nach 90 Minuten ist zwischen den Gruppen kein Unterschied mehr zu erkennen. Gezeigt werden die Mittelwerte von jeweils 4-5 unabhängigen Versuchen $+\text{SEM}$ bzw. $-\text{SEM}$.

Innerhalb von 5 Minuten nach der Glukosegabe (i.p.) kommt es zu einem starken Anstieg der pankreatischen Insulinsekretion, die sich nach ca. 45 Minuten auf einem basalen Niveau stabilisiert. Der Vergleich der Kurvenverläufe von ANG IV-behandelten Tieren mit den NaCl-behandelten Kontrolltieren zeigt eine ähnliche initiale Insulinsekretionssteigerung 5 Minuten nach der Glukosegabe. Der Plasmainsulinspiegel der ANG IV-behandelten Tiere bleibt dann jedoch erhöht und nähert sich erst nach 45 Minuten wieder dem Insulinspiegel der Kontrolltiere an. Nach 90 Minuten ist kein Unterschied mehr zwischen den Plasmainsulinspiegeln der beiden Gruppen zu erkennen.

Die erhöhten Plasmainsulinspiegel nach einer 15 minütigen Versuchsdauer unter ANG IV-Gabe bestätigen die Ergebnisse, die in den Blutglukoseuntersuchungen gewonnen werden konnten. Die erhöhte Insulinkonzentration führt zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen und so zu einer Abnahme der Blutglukosekonzentration. ANG IV zeigt in diesem Versuch keinen Einfluss auf die Insulinsekretion, sondern verlängert scheinbar die Insulinwirkung.

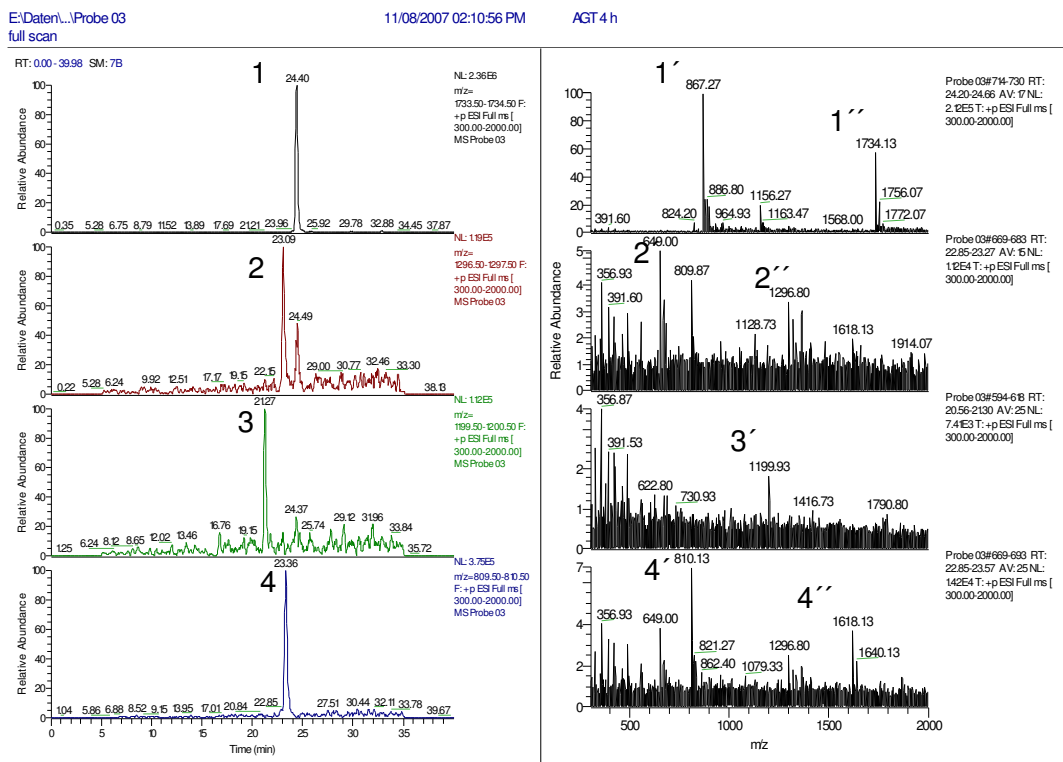
5.7 HPLC-MS

5.7.1 Qualitative HPLC-MS

Neben den Rezeptoren des RAS und AGT als Präkursorprotein in den Inselzellen konnten im Gesamtpankreas auch ANG II, ANG III und ANG 1-7 per Western Blot identifiziert werden. Ebenso konnte (Pro)Renin in der humanen β -Zelle nachgewiesen werden. Das wissenschaftliche Interesse richtet sich nun auf das RAS der INS-1 Zelle und damit die Fähigkeit, durch zellgebundene Enzyme bioaktive Angiotensin Peptide zu erzeugen. Der Nachweis der Metabolite erfolgt mittels HPLC-MS. Die Ergebnisse sind nur eingeschränkt quantitativ auszuwerten, da aufgrund der hohen unphysiologischen Peptid-Konzentrationen die abbauenden Enzyme gesättigt sein können. Hinzu kommt, dass aufgrund unterschiedlicher Ionisierbarkeit der peptidischen Bruchstücke bei der Elektrospray-Ionisation (ESI) die gemessenen Intensitäten nicht mit ihrem quantitativen Anteil übereinstimmen. Bei einer schlechten Ionisierbarkeit eines Peptids wird das Bruchstück somit im Detektor nicht proportional quantitativ erfasst.

Exemplarisch sind typische Massenspektren zur Veranschaulichung der HPLC-MS Messung aufgeführt. In der linken Spalte der folgenden Abbildungen sind Retentionszeit (RT) und relative Intensität (Relative Abundance) des jeweiligen Angiotensinabbauproduktes angegeben. Bei der schonenden Elektrospray-Ionisation (ESI) entstehen vorwiegend ein- bzw. zweifach positiv geladene Molekülonen. Die auf der rechten Seite der Abbildung dargestellten Massenspektren zeigen den einfach positiv geladenen Molpeak $M=(m/z)-1$ sowie das Signal des zweifach positiv geladenen Moleküls $M=(2(m/z))-2$. Die Identifikation erfolgt über die molekulare Masse des jeweiligen Abbauproduktes. Aufgetragen ist hier der Quotient aus Masse und Ladung gegen die relative Menge (%).

5.7.1.1 Abbau von Angiotensinogen

Abbildung 5-26: Abbau von 100 μM AGT durch INS-1 Zellen über 4 Stunden

Gezeigt wird ein repräsentatives Massenspektrum ($n = 2$)

1) AGT, mit einer RT-Zeit von 24,40 Minuten und einer molaren Masse von 1733 g / mol, wird in einer Konzentration von 100 μM im Überstand von INS-1 Zellen 4 Stunden inkubiert. (1') zeigt den einfach protonierten Molpeak (1734 m/z) des Peptids; (1'') die zweifach protonierte Form (867 m/z). Es konnten die folgenden Abbauprodukte identifiziert werden. 2) ANG I (M_G) 1296 g / mol, mit einer RT-Zeit von 23,09 Minuten in der einfach (2'') und zweifach (2') protonierten Form. 3) ANG 5-14 (M_G) 1199 g / mol mit einer RT-Zeit von 21,27 Minuten ausschließlich in der einfach (3') protonierten Form. 4) Das N-terminale Abbauprodukt ANG 2-14 mit einem M_G von 1617 g / mol und einer RT-Zeit von 23,36 Minuten konnte ebenfalls identifiziert werden. (4') und (4'') zeigen die zweifach bzw. einfach protonierte Form des Peptids.

Tabelle 5.1: Dargestellt werden die Mittelwerte der Intensität aus zwei Versuchen.

Bruchstück	M_G	Intensität 2 h	Intensität 4 h
AGT	1733 g / mol	$3,03 \times 10^6$	$2,33 \times 10^6$
ANG I (1-10)	1296 g / mol	$1,28 \times 10^5$	$1,16 \times 10^5$
ANG 5-14	1200 g / mol	$0,54 \times 10^5$	$0,97 \times 10^5$
ANG 2-14	1617 g / mol	$2,96 \times 10^5$	$3,75 \times 10^5$

Abbildung 5-26 zeigt den Abbau des Tetradecapeptids Angiotensinogen (AGT) im Überstand adhärenter INS-1 Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden.

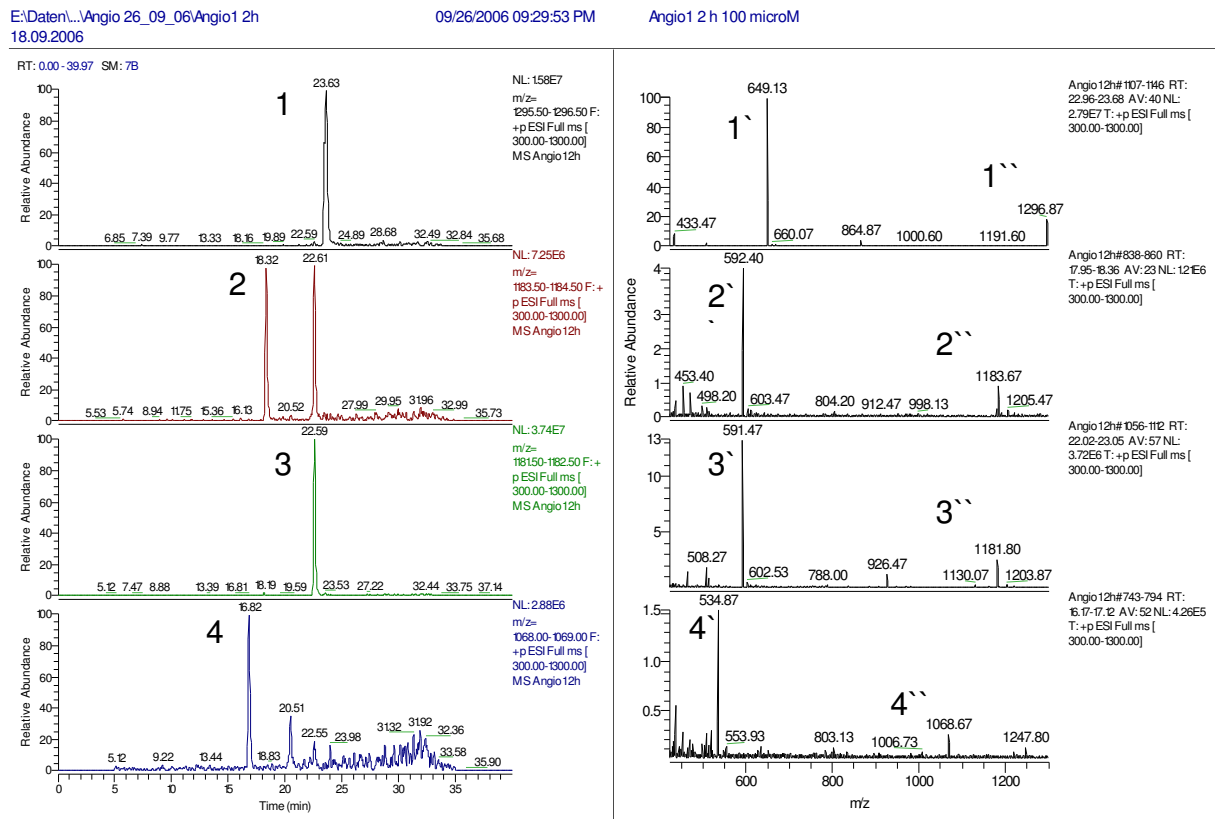
Der Abbau erfolgt dabei sowohl N- als auch C-terminal durch Abspaltung der Tetrapeptide ANG 1-4 und ANG 11-14, die im Massenspektrum jedoch nicht nachgewiesen werden konnten. Sie werden vermutlich schnell durch Aminopeptidasen in ihre Monomere überführt und entgehen so einer Detektion.

Durch die Abspaltung der oben genannten Tetrapeptide entstehen die Peptide ANG I und ANG 5-14. Ihre Massenspur im Spektrum zeigt jedoch, dass sie nur in sehr geringem Ausmaß entstehen oder sehr schlecht ionisiert werden.

Eine Kumulation von ANG I lässt sich nicht feststellen. Dies zeigt, dass gebildetes ANG I direkt weiter abgebaut wird.

Weiterhin konnte ein N-terminales Abbauprodukt mit dem Molekulargewicht 1617 g / mol identifiziert werden, dies entspricht dem Abbauprodukt ANG 2-14.

5.7.1.2 Abbau von ANG I

Abbildung 5-27: Abbau von 100 μ M ANG I durch INS-1 Zellen über 2 Stunden

Gezeigt wird ein repräsentatives Massenspektrum, (n = 2)

1) Angiotensin I mit der RT-Zeit 23,63 Minuten und einem Molekulargewicht von 1295,8 g / mol ist in einer Konzentration von 100 μ M dem Inkubationspuffer zugespielt worden. Die Inkubation erfolgt über 4 Stunden. Das Massenspektrum (MS) zeigt ein einfach ($1'$) und ein zweifach ($1''$) protoniertes Fragment, bei dem es sich jeweils um Angiotensin I handelt. Die hohe Intensität korreliert mit der eingesetzten hohen Dosis von 100 μ M. **2)** Das C-terminale Abbauprodukt ANG 1-9 mit der RT-Zeit 18,32 Minuten und dem Molekulargewicht 1182 g / mol zeigt ebenfalls ein einfach ($2''$) und ein zweifach ($2'$) protoniertes Fragment im Massenspektrum. **3)** Bei einer RT-Zeit von 22,59 Minuten erscheint das N-terminale Abbauprodukt ANG 2-10 mit dem M_G 1181 g / mol ($3',3''$). **4)** Dargestellt ist das Abbauprodukt ANG 2-9 mit dem M_G 1068 g / mol ($4',4''$).

Tabelle 5.2: Dargestellt werden die Mittelwerte der Intensität aus zwei Versuchen.

Bruchstück	M_G	Intensität 2 h	Intensität 4 h
ANG I (1-10)	1295,33	$1,76 \times 10^8$	$1,12 \times 10^8$
ANG 1-9	1182,15	$6,63 \times 10^6$	$1,80 \times 10^7$
ANG 2-10	1181,33	$3,14 \times 10^7$	$8,00 \times 10^7$
ANG 2-9	1068,15	$2,41 \times 10^6$	$6,26 \times 10^6$
ANG II (1-8)	1044,99	$3,86 \times 10^6$	$6,85 \times 10^6$
ANG 3-10	1025,33	$3,67 \times 10^6$	$3,05 \times 10^7$
ANG 4-10	926,18	$8,56 \times 10^6$	$2,05 \times 10^7$
ANG 1-7	897,80	$8,68 \times 10^6$	$1,91 \times 10^7$
ANG 1-6	800,67	$1,76 \times 10^6$	$1,44 \times 10^7$
ANG 2-7	783,80	$3,86 \times 10^6$	$8,34 \times 10^7$
ANG 1-5	762,99	$8,00 \times 10^6$	$9,70 \times 10^8$

In der Tabelle 5.2 als auch in Abbildung 5-10 sind die Peptide aufgeführt, die bei dem Verdau von ANG I im Überstand von INS-1 Zellen innerhalb einer Inkubationszeit von 2 Stunden bzw. 4 Stunden entstehen und mittels HPLC-MS detektiert werden konnten. ANG I wird initial in die Peptide ANG 2-10, ANG II und ANG 1-9 gespalten. Die gemessenen relativen Mengen der gebildeten Peptide deuten aber eher darauf hin, dass in erster Linie die Bruchstücke ANG 2-10 ($8,00 \times 10^7$) und ANG 1-9 ($1,8 \times 10^7$) entstehen. ANG II entsteht vermutlich über ACE-1 nur zu einem geringen Teil ($6,85 \times 10^6$). Aufgrund der geringen Empfindlichkeit dieser Methode ist es nicht verwunderlich, dass die aus ANG II entstehenden, bioaktiven Peptide ANG III und ANG IV nicht nachgewiesen werden können. ANG 2-10 wird N-terminal zu den Peptiden ANG 3-10 und ANG 4-10 abgebaut. Der Abbau von ANG 1-9 erfolgt C-terminal zu den Peptiden ANG II oder über ACE-1 direkt zu ANG 1-7, welches auch durch Neprilysin direkt aus ANG I gebildet werden kann. Die Entstehung von ANG II aus ANG 1-9 ist aber unwahrscheinlich, da dies schon in 3T3-L1 Adipozyten nur zu einem geringen Teil geschieht^[4]. ANG 1-7 wird wiederum zu ANG 1-6 und ANG 1-5 metabolisiert. Weiterhin konnten noch ANG 2-9 und ANG 2-7 identifiziert werden, die vermutlich aus ihren direkten Präkursorproteinen entstehen. Im Falle von ANG 2-9 wären dies ANG 2-10 und ANG 1-9. ANG 2-7 wird vermutlich aus ANG 1-7 gebildet. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass es direkt aus ANG III gebildet wird, welches aber, wie von 3T3-L1 Adipozyten bekannt, extrem schnell eliminiert wird und so nicht mehr nachweisbar ist^[4]. Die physiologische Bedeutung der Abbauprodukte ANG 2-9, ANG 2-7, ANG 1-6 und ANG 1-5, die hier identifiziert werden konnten, ist bisher nicht bekannt. Um weitere Abbauprodukte des Angiotensin-Metabolismus zu identifizieren, müsste die Empfindlichkeit der Methode erhöht werden.

5.7.1.3 Abbau von ANG II

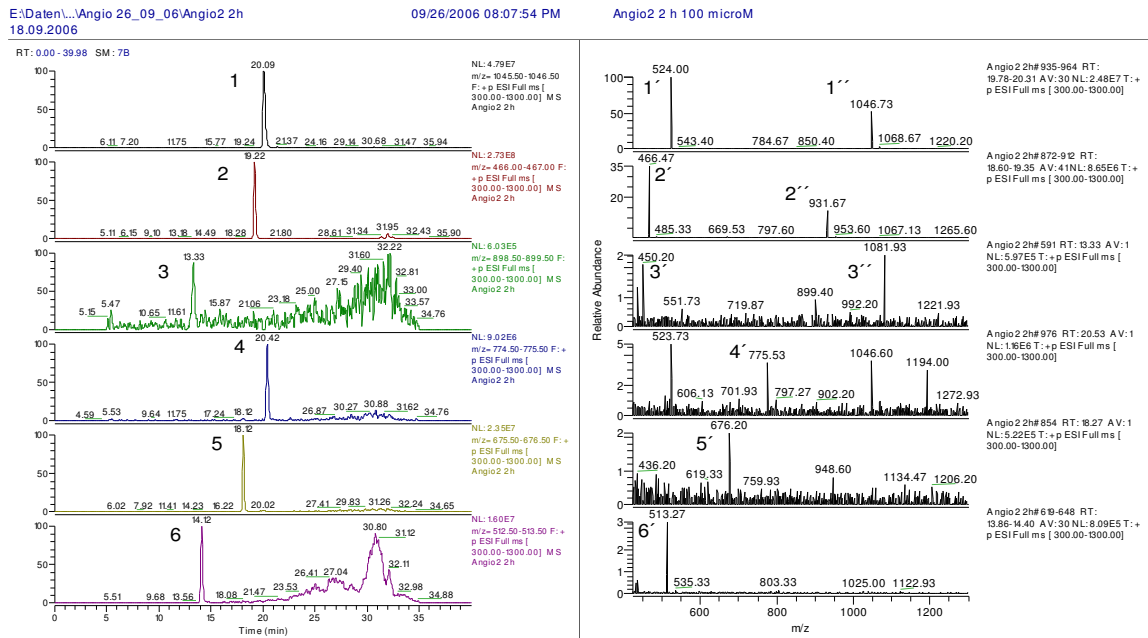


Abbildung 5-28: Abbau von 100 µM ANG II durch INS-1 Zellen über 2 Stunden

Gezeigt wird ein repräsentatives Massenspektrum, (n = 2)

1) ANG II wird in einer Konzentration von 100 µM im Überstand von INS-1 Zellen 2 Stunden inkubiert. Im MS erkennt man bei einer RT-Zeit von 20,09 Minuten das zweifach protonierte Peptid (1') sowie den einfach protonierten Molpeak (1'') in einer hohen Intensität. 2) Das N-terminale Abbauprodukt ANG III (2-8) erscheint mit einer RT-Zeit von 19,22 Minuten im MS, sowohl die zweifach (2') als auch die einfach (2'') protonierte Form des Peptids sind zu identifizieren. 3) ANG 1-7 ist nach 4 Stunden Inkubation im MS nur in Spuren (3',3'') zu erkennen. Der N-terminale Abbau der AS Phenylalanin führt hier zu einer Verkürzung der RT-Zeit auf 13,33 Minuten. 4) ANG IV wird bei einer RT-Zeit von 20,82 Minuten detektiert. Im MS ist ausschließlich die einfach protonierte Form nachzuweisen (4'). Dies deutet darauf hin, dass bei den gewählten Bedingungen die Guanidinfunktion des Arginins an Position 2 sowie der Imidazolstickstoff des Histidins an Position 6 protoniert wird. 5) ANG 4-8 (RT-Zeit: 18,12 Minuten) und 6) ANG 5-8 (RT-Zeit: 14,38 Minuten) zeigen ebenfalls nur den jeweiligen Molpeak (5',6'). Der N-terminale Abbau der phenolischen AS Tyrosin führt, ähnlich wie bei der Abspaltung von Phenylalanin, zu einer Verkürzung der RT-Zeit.

Tabelle 5.3: Dargestellt werden die Mittelwerte der Intensität aus zwei Versuchen.

Bruchstück	M _G	Intensität 2 h	Intensität 4 h
ANG II (1-8)	1044,99	4,96 × 10 ⁸	4,15 × 10 ⁸
ANG III (2-8)	930,99	1,23 × 10 ⁷	6,39 × 10 ⁷
ANG 1-7	897,80	6,03 × 10 ⁵	7,23 × 10 ⁶
ANG IV (3-8)	774,99	1,09 × 10 ⁷	3,17 × 10 ⁷
ANG 4-8	675,84	3,12 × 10 ⁷	1,87 × 10 ⁷
ANG 5-8	512,65	1,80 × 10 ⁷	2,16 × 10 ⁷

Die Abbauprodukte des Octapeptids ANG II (Abbildung 5-28), die durch enzymatische Degradation an der β -Zellmembran und durch lösliche Enzyme entstehen, werden nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bzw. 4 Stunden analysiert. Eine exakte quantitative Aussage über den Anteil der Abbauprodukte ist aufgrund unterschiedlicher Ionisierbarkeit der Metabolite nur begrenzt möglich. Wie auch in Adipozyten^[205], zeigt sich, dass der Abbau von ANG II zu ANG 5-8 in INS-1 Zellen eine vorrangige Bedeutung hat. Der bioaktive Metabolit ANG 1-7 kann nur in Spuren nachgewiesen werden und scheint keine Bedeutung bei der Degradation von ANG II zu spielen. Der Abbau von Angiotensin II erfolgt also in erster Linie durch Aminopeptidasen (z.B. APA) am N-terminalen Ende des Peptids. Die bioaktiven Metabolite ANG III und ANG IV sowie der Metabolit ANG 4-8 können ebenfalls identifiziert werden.

5.7.1.4 Abbau von ANG III

Tabelle 5.4: Dargestellt werden die Mittelwerte der Intensität aus zwei Versuchen.

Bruchstück	M _G	Intensität 2 h	Intensität 4 h
ANG III (2-8)	930,99	$5,29 \times 10^8$	$5,20 \times 10^8$
ANG IV (3-8)	774,99	$4,12 \times 10^7$	$2,17 \times 10^8$
ANG 4-8	675,84	$2,18 \times 10^7$	$3,78 \times 10^7$
ANG 5-8	512,65	$2,47 \times 10^7$	$3,93 \times 10^7$

ANG III wird über ANG IV zu ANG 4-8 und ANG 5-8 metabolisiert. Auch hier sind ausschließlich N-terminale Abbauprodukte zu identifizieren. Ein Fehlen von Carboxypeptidasen an der INS-1 Zellmembran könnte als Erklärung dienen.

5.7.1.5 Abbau von ANG IV

Tabelle 5.5: Dargestellt werden die Mittelwerte der Intensität aus zwei Versuchen.

Bruchstück	M _G	Intensität 2 h	Intensität 4 h
ANG IV (3-8)	774,99	$6,16 \times 10^8$	$2,66 \times 10^7$
ANG 4-8	675,84	$4,65 \times 10^6$	$1,99 \times 10^7$
ANG 5-8	512,65	$1,20 \times 10^8$	$4,63 \times 10^7$

ANG IV wird scheinbar sehr schnell metabolisiert. Innerhalb von 2 Stunden sinkt die Intensität der Ausgangssubstanz um eine Zehnerpotenz. Der schnelle Abbau von ANG IV zeigt, dass die Konzentration dieses Peptids mit intrinsischer Aktivität am AT₄-Rezeptor in der Umgebung von INS-1 Zellen streng reguliert wird. Es bleibt

offen, ob IRAP nun ein Rezeptor oder auch ein abbauendes Enzym für das Hexapeptid ANG IV ist. Die Metabolite des ANG IV-Abbaus sind die schon bekannten Peptide ANG 4-8 und ANG 5-8.

5.7.1.6 Abbau von ANG 4-8

Tabelle 5.6: Dargestellt werden die Mittelwerte der Intensität aus zwei Versuchen.			
Bruckstück	M_G	Intensität 2 h	Intensität 4 h
ANG 4-8	675,84	$7,20 \times 10^8$	$1,42 \times 10^8$
ANG 5-8	512,65	$6,20 \times 10^7$	$3,27 \times 10^8$

Der Hauptmetabolit des Pentapeptids ANG 4-8 ist wie erwartet das Tetrapeptid ANG 5-8. So konnte gezeigt werden, dass der Abbau von ANG II in INS-1 Zellen alleine durch Aminopeptidasen erfolgt. Welche Aminopeptidasen an der N-terminalen Hydrolyse der Peptide beteiligt sind ist nicht geklärt. Dies erfordert weitere Untersuchungen.

5.7.2 Quantitative HPLC-MS

Die Quantifizierung der ANG IV-Konzentration in der Umgebung von INS-1 Zellen soll Rückschlüsse auf die Bedeutung des Peptids für die INS-1 Zellfunktion zulassen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des internen Standards Sarile, einem synthetischen und schwer abbaubaren ANG II-Analogon. Saril besitzt zum einen ein anderes Molekulargewicht als andere Angiotensin Peptide, zum anderen unterscheidet es sich in seiner Retentionszeit von dem zu quantifizierenden ANG IV, so dass eine Integration der Signale unproblematisch ist.

5.7.2.1 Quantifizierung des ANG II- und ANG III-Abbaus

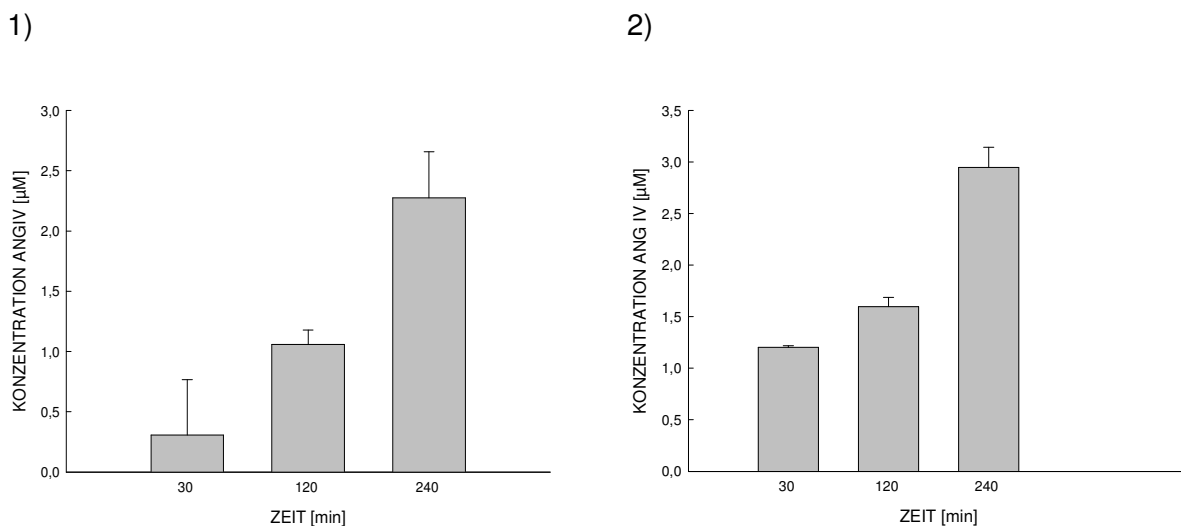


Abbildung 5-29: Bildung von ANG IV aus (1) ANG II (100 µM) und (2) ANG III (100 µM) durch INS 1 Zellen

$\bar{x} + \text{SEM}$; $n = 3$ (Dreifachbestimmung an einer INS-1 Zellpopulation)

Die Quantifizierung des durch den Abbau von ANG II und ANG III entstehenden ANG IV über eine Inkubationszeit von 4 Stunden macht deutlich, dass es nicht zu einer Kumulation des Peptids kommt. Die ANG IV-Konzentration wird durch membranständige Aminopeptidasen streng kontrolliert. Sowohl beim Abbau von ANG II (100 µM) als auch bei der Degradation von ANG III (100 µM) entstehen nach 4 Stunden Inkubation nicht mehr als 3 µM ANG IV. Dass sogar aus dem Vorläuferprotein ANG III nicht mehr als 3 % ANG IV entstehen, bestätigt, wie rigide die Entstehung bzw. die Inaktivierung des Peptids überwacht wird (Abbildung 5-29).

Da bei der qualitativen Analyse des ANG I-Abbaus kein ANG IV nachgewiesen werden konnte, wurde hier auf eine Quantifizierung verzichtet

5.7.2.2 Quantifizierung des ANG IV-Abbaus

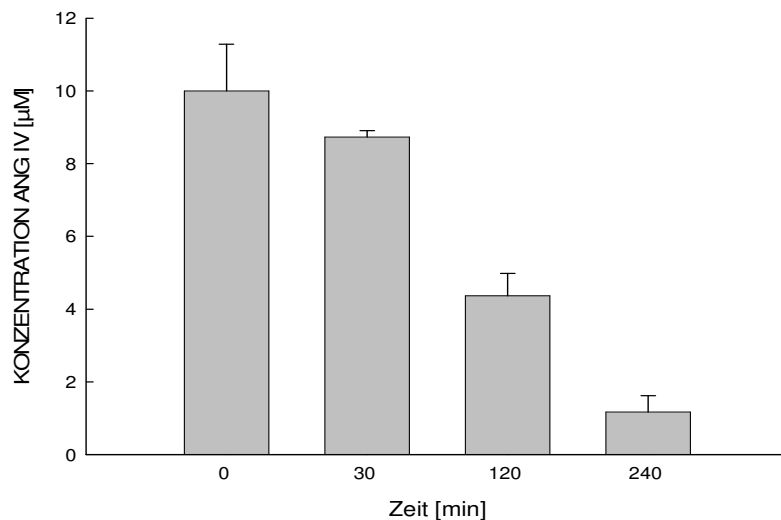


Abbildung 5-30: Abbau des Hexapeptids ANG IV (10 µM)
+ SEM; n = 3 (Dreifachbestimmung an einer INS-1 Zellpopulation)

Die Metabolisierung des Hexapeptids ANG IV bestätigt die in Kapitel 4.3.2.1 gewonnenen Ergebnisse. Die ANG IV-Konzentration sinkt innerhalb der 4 Stunden Inkubationszeit auf ca. 20 % der Ausgangsmenge (Abbildung 5-30). Es bleibt also festzuhalten, dass vor allem der N-terminale Abbau für die Kontrolle der ANG IV-Menge ausschlaggebend ist. Kritisch anzumerken bleibt, dass es sich bei den eingesetzten ANG IV-Konzentrationen nicht um physiologische Mengen handelt. Der physiologische Bereich der ANG IV-Konzentration liegt vermutlich eher im picomolaren Bereich. Die Linearität der Methode ist bei Konzentrationen < 1 µM nicht mehr gegeben. Vermutlich hängt dies mit einer Ionensuppression zusammen, die in diesem Bereich zum Tragen kommt.

6 Diskussion

6.1 Der AT₄-Rezeptor / IRAP in der β -Zelle

6.1.1 Lokalisation und vesikuläre Speicherung

Literaturvergleich

Bislang wurde der AT₄-Rezeptor / IRAP immunchemisch an 4 μ m dicken Pankreasschnitten von Inselzellen des Menschen und Nagers nachgewiesen^[46, 210]. Ein direkter Nachweis in der β -Zelle fehlt. Kobayashi et al. zeigen, dass die Proteine IRAP und GLUT4 in einigen Zellen der Langerhans-Inseln kolokalisiert sind. Aus ihren Ergebnissen geht allerdings nicht hervor, um welche Zellpopulation es sich hier handelt^[46]. Sie vermuten jedoch, dass es sich um β -Zellen handelt, an denen auch die Expression des Insulinrezeptors nachgewiesen werden konnte^[211, 212]. Insulin könnte in der β -Zelle durch Aktivierung des Insulinrezeptors zur Translokation der GLUT4- und IRAP-haltigen Vesikel führen und so die Glukoseaufnahme steigern. Lange bekannt ist, dass die Verstoffwechslung der Glukose zu einem Anstieg der ATP-Konzentration in der β -Zelle führt mit der Folge, dass ATP-abhängige K⁺-Kanäle geschlossen werden und es dadurch zur Depolarisation der Zellmembran und zur Öffnung spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle kommt. Der resultierende Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration setzt die exozytotische Sekretion von Insulingranula in Gang. Diese autokrine, stimulatorische Wirkung von Insulin auf die Insulinsekretion wird jedoch seit langem kontrovers diskutiert, da in der Vergangenheit eher eine hemmende Wirkung von Insulin auf die Insulinsekretion gezeigt werden konnte^[213, 214].

AT₄-Rezeptor / IRAP-Proteinnachweis

In der vorliegenden Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, den AT₄-Rezeptor / IRAP in der β -Zelllinie (INS-1) per Western Blot nachzuweisen. Der AT₄-Rezeptor / IRAP ergänzt somit das RAS des endokrinen Pankreas und wird in der β -Zelle, neben dem schon nachgewiesenen AT₁-Rezeptor, exprimiert. Allerdings kann der GLUT4-Transporter in der INS-1 Zelle nicht nachgewiesen werden.

Da IRAP bisher hauptsächlich als Markerprotein in GLUT4-Speichervesikeln (GSV), in Fett- und Muskelzellen charakterisiert wurde^[109, 215], ist die Entdeckung von

IRAP-haltigen Vesikeln, die keine Glukosetransporter aufweisen, interessant und widerspricht den Vermutungen von Kobayashi et al..

Eine Translokation der IRAP-haltigen Vesikel, ausgelöst durch einen Insulinstimulus, kann die Glukoseaufnahme der β -Zelle nicht erhöhen, da der GLUT4-Transporter in der β -Zelle nicht vorhanden ist. Eine stimulatorische Wirkung von Insulin auf die Insulinsekretion ist daher eher unwahrscheinlich.

Dies widerspricht den Untersuchungen von Kulkarni et al. an β -Zell-spezifischen Insulinrezeptor knock-out Mäusen. Der gewebsspezifische knock-out erfolgt durch das sogenannte Cre-loxP-System^{xvii[216]}. Die Mäuse mit dem selektiven Insulinrezeptor knock-out zeigen nach Gabe eines Glukosebolus eine reduzierte initiale Insulinsekretion und dadurch bedingt eine gestörte Glukosetoleranz. Die Autoren vermuten, dass Insulin über den Insulinrezeptor der β -Zelle einen positiven Feedback auf die Insulinsekretion zeigt^[217].

Da der IRAP-Proteinnachweis unter reduzierenden Bedingungen erfolgt (mit DTT), bleibt offen, ob in der β -Zelle auch Homodimere von IRAP exprimiert werden, die evtl. eine Tyrosinkinaseaktivität aufweisen: unter reduzierenden Bedingungen wird die Disulfidbrücke des Homodimers gespalten und im Blot wird nur das Rezeptormonomer nachgewiesen^[218].

6.1.1.1 Lokalisation des AT₄-Rezeptors / IRAP

Literaturvergleich (Adipozyten, Muskelgewebe)

Die intrazelluläre Speicherung in GSV und die Insulin-abhängige Translokation des AT₄-Rezeptors / IRAP in Adipozyten wurde von Kandror et al. 1994 erstmalig beschrieben^[109] und von Malide et al. bestätigt^[219].

In nicht durch Insulin stimulierten Adipozyten sind mehr als 90 % des AT₄-Rezeptors / IRAP endosomal in der Nähe des Zellkerns gespeichert. Weniger als 10 % des AT₄-Rezeptor / IRAP sind an der Zelloberfläche lokalisiert^[220, 221]. Innerhalb von 5 Minuten nach einem Insulinstimulus sind mehr als 50 % des zellulären Anteils des Rezeptors an die Zelloberfläche transloziert und in die Zellmembran integriert^[222]. Die charakteristische subzelluläre Verteilung des AT₄-Rezeptors / IRAP unter basalen und Insulin-stimulierten Bedingungen wird durch dynamische intrazelluläre Umverteilungsprozesse aufrechterhalten. Im Basalzustand

^{xvii} Die Cre-Rekombinase aus Bakteriophagen eliminiert spezifisch die bakterielle DNA-Sequenz LoxP aus dem Genom

der Zelle kommt es zu einer schnellen bidirektionalen und repetitiven Umverteilung des AT₄-Rezeptors / IRAP zwischen den speziellen Insulin-sensitiven Speicherkompartimenten (GSV) und Endosomen ($t_{1/2} = 20$ Minuten). Zusätzlich werden plasmamembranständige GLUT4-Transporter und AT₄-Rezeptor / IRAP Clathrin-gesteuert endozytiert und der dynamischen Retention zugeführt. Die Bereitschaft der GSV, mit Endosomen zu fusionieren, ist im Vergleich zu einer Fusion mit der Plasmamembran im Basalzustand um den Faktor 5 erhöht und erklärt die intrazelluläre Anreicherung. Die Halbwertszeit für die konstitutive Translokation der GSV an die Plasmamembran beträgt 230 Minuten, für die Insulin-stimulierte Translokation nur 9 Minuten^[220, 223].

Die in der Fettzelle beschriebenen Speicherkompartimente für GLUT4-Transporter und AT₄-Rezeptor / IRAP sind auch von Aledo et al. in der Skelettmuskulatur der Ratte beschrieben worden^[224].

Neben dem Muskelgewebe, in dem es auch zu einer Insulin-induzierten Translokation der IRAP-haltigen Vesikel kommt, wird der AT₄-Rezeptor / IRAP auch in Geweben exprimiert, die den GLUT4-Transporter nicht aufweisen, wie Niere, Milz, Leber und Gehirn^[112]. Dies verdeutlicht, dass der AT₄-Rezeptor / IRAP nicht spezifisch in Insulin-sensitiven Geweben exprimiert wird, und unterstützt die Hypothese eines speziellen intrazellulären, vesikulären Speicherkompartiments, welches durch unbekannte Stimuli zum transienten Remodeling der Zelloberfläche beiträgt. Der AT₄-Rezeptor / IRAP scheint ein Bestandteil dieser endosomalen Speichervesikel zu sein.

Die subzelluläre Verteilung des AT₄-Rezeptors / IRAP unterscheidet sich von den anderen Mitgliedern der Familie Zink-abhängiger Aminopeptidasen, welche konstitutiv an der Zelloberfläche exprimiert werden^[256]. Der Unterschied liegt in der Strukturierung des N-terminalen zytoplasmatischen Bereichs. Dieser Bereich trägt alle Informationen für die spezifische intrazelluläre Lokalisation und Insulin-induzierte Translokation^[223]. Von besonderer Bedeutung ist ein Bereich der zytoplasmatischen Domäne, der 29 AS umfaßt, und zwei Dileucinmotive in Position 76 und 77, eingerahmt von sauren AS, aufweist. Dieser Bereich ist für die dynamische Speicherung der GSV essentiell^[117, 225, 226]. Einige intrazelluläre Proteine interagieren mit diesem zytoplasmatischen Bereich und sind an der endosomalen Retention dieser Vesikel beteiligt^[227, 228].

Lokalisation in der β -Zelle

Durch die Transfektion des IRAP-GFP pcDNA3 Plasmids in die β -Zelllinie INS-1 kann nach dem Proteinnachweis per Western Blot auch die subzelluläre Lokalisation des AT_4 -Rezeptors / IRAP durch CLSM-Aufnahmen bestimmt werden. Ähnlich wie in Fett- und Muskelzellen sind die IRAP-Vesikel zu großen Teilen im Bereich des ER dem Zellkern angrenzend lokalisiert. Einzelne zytosolische sowie in die Plasmamembran integrierte Vesikel sind auf den Aufnahmen deutlich zu erkennen. Bei der mikroskopischen Betrachtung lebender, stabil transfizierter INS-1 Zellen im konfokalen System konnte eine Eigenbewegung dieser zytosolischen IRAP-Vesikel beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die intrazelluläre Speicherung der IRAP-Vesikel kann in den INS-1 Zellen nicht durch einen Insulinstimulus beeinflusst werden, obwohl, wie schon erwähnt, der Insulinrezeptor auch in der β -Zelle exprimiert wird. In Insulin-sensitiven Zellen kommt es nach Aktivierung des Insulinrezeptors über eine Tyrosinkinase zur Aktivierung des Insulinrezeptorsubstrats (IRS). Die weitere Postrezeptorkaskade führt über die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) zu einer Aktivierung der Proteinkinase B (PKB) und zur Translokation der GSV an die Plasmamembran. In der INS-1 Zelle ist diese Signalkaskade scheinbar nicht ausgebildet, so dass Insulin in den mikroskopischen Untersuchungen keinen Effekt auf die Vesikeltranslokation zeigt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Anders als in Adipozyten oder Muskelzellen, die ein endosomales und ein insulinsensitives Speicherkompartiment ausbilden, scheint der AT_4 -Rezeptor / IRAP in der β -Zelle nur in einem Insulin-unabhängigen Speicherkompartiment vorzukommen. Thorens et al. konnten dieses Speicherkompartiment in der β -Zelle näher charakterisieren, indem sie die β -Zelllinie RINm5F mit dem Glukosetransporter GLUT4 transfizierten und die subzelluläre Lokalisation mit Hilfe von Immunofluoreszenz- und Immunoelektronenmikroskopiestudien untersuchten.

Sie zeigen, dass der transfizierte GLUT4-Transporter in Vesikeln in Bereichen des trans-Golgi-Netzwerks (TGN), das ist der dem ER abgewandte Anteil des für Sekretions- und Speichervorgänge zuständigen Golgi-Apparats, sowie in Bereichen der Plasmamembran zu finden ist. Diese Vesikel translozieren konstitutiv zwischen der Plasmamembran und dem intrazellulären Speicherkompartiment. Kolokalisationsuntersuchungen zeigen zusätzlich, dass sich die Vesikelpopulation, die den transfizierten GLUT4-Transporter enthält, von den Insulingranula

unterscheidet^[229]. In der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 kann ein IRAP-Speicherkompartiment mit ähnlichen Speichereigenschaften identifiziert werden^[215].

Die von uns in der INS-1 Zelllinie nachgewiesenen IRAP-haltigen Vesikel stimmen mit hoher Wahrscheinlichkeit mit den von Thorens et al. in der RINm5F Zelllinie identifizierten Vesikeln überein. Die intrazelluläre Sortierung in die jeweilige Vesikelpopulation erfolgt über Dileucin-Motive des zytoplasmatischen Anteils der Proteine. Sowohl GLUT4-Transporter als auch IRAP weisen diese Speichermotive auf.

6.1.1.2 Vesikuläre Speicherung des AT₄-Rezeptors / IRAP

Literaturvergleich

Das Makrolidantibiotikum Bafilomycin A₁ ist ein Inhibitor der vakuolären Protonenpumpe^[207] (V-Typ H⁺-ATPase) und verursacht einen Anstieg des endosomalen pH-Werts. Konzentrationen bis 1 µM inhibieren selektiv die V-Typ H⁺-ATPase, mitochondriale ATPasen bleiben unbeeinflusst^[230]. Bafilomycin A₁ beschleunigt in Insulin-sensitiven 3T3-L1 Adipozyten die Translokation von GLUT4-Transportern^[208] und die Insulinsekretion wird in der β-Zelllinie Min6 in Konzentrationen von 10-50 nM durch Aktivierung des Insulinsignalwegs verstärkt. Höhere Konzentrationen zeigen diese Effekte in der Min6 Zelllinie nicht mehr^[230]. In mikromolaren Konzentrationen beschleunigt Bafilomycin A₁ nach 30 minütiger Inkubation in Inselzellen des Hundes die Insulinfreisetzung, vermutlich aufgrund der Anhebung des intravesikulären pH-Werts^[21].

Mit GLUT4 transfizierte Insulinomazellen zeigen, verglichen mit unseren Untersuchungen, eine übereinstimmende zytoplasmatische Vesikelverteilung nach einer vierstündigen Inkubation mit 1 µM Bafilomycin A₁^[229]. Versuche an 3T3-L1 Adipozyten zeigen ähnliche Resultate. Insulin führt hier PI3K-abhängig zu einer Anhebung des endosomalen pH-Werts und zu einer Translokation der GSV an die Plasmamembran^[208]. Die durch Bafilomycin A₁ ausgelöste Translokation von GLUT4-Transportern in Adipozyten lässt sich nicht mit Wortmannin, einem Inhibitor der PI3K, aufheben.

Vesikuläre Speicherung

In der INS-1 Zelllinie wird mittels einer vierstündigen Inkubation mit 10 μM Bafilomycin A₁ die intrazelluläre Speicherung der AT₄-Rezeptor / IRAP-haltigen Vesikel im Bereich des TGN aufgehoben. Es kommt zu einer diffusen Verteilung der Vesikel im Zytoplasma. Die hier eingesetzte Konzentration Bafilomycin A₁ liegt mit 10 μM leicht über den Konzentrationsbereichen anderer Studien. Jedoch zeigen auch niedrigere Konzentrationen (0,5 μM), die laut Literatur spezifisch die V-Typ H⁺-ATPase hemmen, eine Entspeicherung der Vesikel (Ergebnis nicht gezeigt). In der Literatur beschriebene toxische Effekte traten auch nach vierstündiger Inkubation mit 10 μM Bafilomycin A₁ an INS-1 Zellen nicht auf.

Die Speicherung der AT₄-Rezeptor / IRAP-haltigen Vesikel in der β -Zelllinie INS-1 erfolgt demnach pH-abhängig. Kommt es zu einem Anstieg des intravesikulären pH-Werts, wird die Retention der Vesikel im Bereich des TGN in der β -Zelle aufgehoben. Ob es durch den erhöhten pH-Wert in den Vesikeln zu einer Änderung der Proteinstruktur des AT₄-Rezeptors / IRAP kommt, wird nicht untersucht. Denkbar wäre, dass die Vesikel über die Dileucinmotive des N-terminalen zytoplasmatischen Bereichs der IRAP pH-abhängig mit Proteinen des TGN interagieren und so den Vesikel im TGN verankern. Eine Anhebung des vesikulären pH-Werts würde durch Änderung der Proteinstruktur diese Proteinanker lösen.

Aus Abbildung 5-7 geht hervor, dass sich die AT₄-Rezeptor / IRAP-haltigen Vesikel nach der Bafilomycin A₁-Behandlung unregelmäßig im Zytoplasma verteilen, jedoch nicht mit der Plasmamembran verschmelzen. Die Alkalisierung der Speichervesikel reduziert das Vermögen, an die Plasmamembran anzudocken und mit ihr zu fusionieren. In Insulinsekretionsversuchen mit 0,5 μM Bafilomycin A₁ kann die Vermutung bestätigt werden, dass durch Anhebung des vesikulären pH-Werts nicht nur die intrazelluläre Speicherung der Vesikel verändert wird, sondern auch die Exozytose der Vesikel gestört ist. Bafilomycin A₁ inhibiert die 5,6 mM Glukose-induzierte Insulinsekretion in der INS-1 Zelllinie auf ca. 75 % (siehe Abbildung 5-14). Sie liegt damit im Bereich der basalen Insulinsekretion, wie sie auch durch eine 3,0 mM Glukoselösung induziert wird.

Die hauptsächlich intrazelluläre Verbreitung des AT₄-Rezeptors / IRAP in der β -Zelle deutet auf wichtige intrazelluläre Funktionen hin, die die Existenz eines intrazellulären RAS der β -Zelle wahrscheinlich macht. Denkbar wäre die Prozessierung zelleigener Proteine durch die IRAP. Die Hemmung der

Aminopeptidasefunktion durch Insulin im IRAP-Assay deutet darauf hin, dass Insulin ein zelleigenes Substrat der IRAP darstellen könnte. Insulin liegt in der β -Zelle wahrscheinlich in Konzentrationen vor, die in Anbetracht seiner IC_{50} im IRAP-Assay (42 μ M) durchaus eine Interaktion mit der katalytischen Funktion der IRAP vermuten lassen. Es ist jedoch zu bedenken, dass sich die Speicherkompartimente von Insulin und IRAP in der β -Zelle unterscheiden, so dass durch die räumliche Trennung eine Interaktion unwahrscheinlich erscheint.

6.1.2 Der AT_4 -Rezeptor

Literaturvergleich

Die meisten ANG IV-induzierten Effekte wurden in nanomolaren Konzentrationen beobachtet und sind durch AT_1 - oder AT_2 -Rezeptorantagonisten wie Losartan, Candesartan, PD123.177 oder PD123.319 nicht aufhebbar^[153, 155, 159, 173, 179, 231-233]. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Bindungsstudien, die in vielen Geweben, in denen [125 I] ANG II nur eine niederaffine Bindung zeigt, eine hochaffine [125 I] ANG IV-Bindungsstelle finden, deutet vieles auf einen spezifischen Rezeptor für das Hexapeptid ANG IV hin^[234].

Einige Effekte, die bislang ANG II zugeschrieben wurden, sind auf den Abbau zu ANG IV zurückzuführen. So ist die zunächst auf ANG II-Wirkung zurückgeführte Steigerung der Dopaminfreisetzung ein ANG IV-vermittelter Effekt, der durch Hemmung der ANG II-metabolisierenden Enzyme APA und APN mit den Aminopeptidaseinhibitoren EC 33 und PC 18 blockiert werden kann^[231].

Allerdings ist ANG IV in höheren Konzentrationen (μ M) auch ein Agonist am AT_1 - und AT_2 -Rezeptor, so dass einige der peripheren und zentralen Wirkungen von ANG IV auf die Bindung an diesen Rezeptoren zurückzuführen sind^[167].

Auf der extrazellulären Domäne von IRAP können zwei Bindungsstellen für das Hexapeptid ANG IV identifiziert werden. Zum einen interagiert ANG IV als Substrat des Enzyms mit der katalytischen Funktion, zum anderen mit einem extrazellulären Bereich in direkter Nachbarschaft zur Plasmamembran. Diese juxtamembranäre Bindungsstelle scheint den eigentlichen AT_4 -Rezeptor zu repräsentieren^[122]. Die Autoren vermuten, dass ANG IV über eine Interaktion an dieser juxtamembranären Bindungsstelle eine Konformationsänderung im Bereich der katalytischen Domäne hervorruft und so die Aminopeptidasefunktion hemmt.

Die Annahme zweier Bindungsstellen durch Caron et al. wird auch durch Bindungsstudien in verschiedenen Geweben unterstützt. Hier konnte neben einer niederaffinen Bindungsstelle auch eine hochaffine ANG IV-Bindungsstelle im niedrigen nanomolaren Bereich identifiziert werden. Ca. 20 % der ANG IV-Bindung entfällt auf diese hochaffine Bindungsstelle^[123, 149, 235]. Viele andere Studien zeigen allerdings nur eine spezifische Bindungsstelle im nanomolaren Bereich^[88, 150, 234, 236]. Die niederaffine Bindungsstelle scheint die Bindung von ANG IV im katalytischen Zentrum darzustellen, die hochaffine Bindungsstelle im subnanomolaren Bereich die Bindung von ANG IV am juxtamembranären AT₄-Rezeptor.

Dies deutet auf die Existenz verschiedener AT₄-Rezeptorsubtypen bzw. unterschiedlicher IRAP-Isoenzyme hin, die sich hinsichtlich ihrer Bindungsstellen unterscheiden^[126]. Unterstützt wird diese Vermutung durch den Nachweis von IRAP-Isoenzymen mit unterschiedlichen Molekulargewichten^[112]. Wie schon in der Einleitung erwähnt, sind auch IRAP-Homodimere mit einem Molekulargewicht von 250 kDa nachgewiesen worden^[218]. Als Homodimer könnte IRAP, ähnlich einem Rezeptor mit einer Tyrosinkinaseaktivität, durch eine AT₄-Rezeptorstimulation Informationen über die Zellmembran in die Zelle weiterleiten. Dieser Mechanismus ist für APN, einem Mitglied der transmembranären M1-Metalloproteasen, zu denen IRAP ebenfalls gehört, bereits beschrieben^[237].

Die dem AT₄-Rezeptor nachgeschaltete Signaltransduktion ist nicht bekannt bzw. es existieren widersprüchliche Angaben. Es ist aber in einer Reihe von Studien deutlich geworden, dass ANG IV den intrazellulären Ca²⁺-Spiegel zum einen durch die Steigerung des extrazellulären Influx, zum anderen durch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern erhöht und so seine Effekte vermittelt^[149, 150, 156, 158, 176, 238, 239].

Andere postulieren eine G-Protein-Rezeptorkopplung in Nierenzellen des Opossums. Die ANG IV-Bindung am AT₄-Rezeptor in den Nierenzellen kann durch Inkubation mit GTPγS aufgehoben werden^[239]. Sie zeigt jedoch keinen Einfluss auf den IP₃-Stoffwechsel, noch kommt es zu einem Anstieg der cAMP- oder cGMP-Spiegel. Die Autoren vermuten, dass ANG IV über einen G_i-gekoppelten Rezeptor cAMP-unabhängig spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle stimuliert. Chen et al. konnten zeigen, dass es durch ANG IV-Stimulation des Endothels der Pulmonalarterie, aber nicht durch Stimulation der glatten Muskelzellen, zu einem Anstieg des cGMP-Spiegels in der glatten Muskelzelle kommt^[156]. So konnte die ANG IV-induzierte

Vasodilatation an einer Ca^{2+} -induzierten gesteigerten NO-Bildung festgemacht werden, die zu einem Anstieg der cGMP-Spiegel und zur Relaxation der Gefäßmuskulatur führt^[156, 157]. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern, wie dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR), erfolgt G-Protein-abhängig über den PLC-, PI3K-Signalweg.

In einer humanen Neuroblastoma Zelllinie, in bovinem Nierenepithel, als auch in Zellen des proximalen Tubulus (HK-2 Zellen) konnten keine Hinweise für einen G-Protein-gekoppelten AT_4 -Rezeptor gefunden werden^[149, 150, 160].

Daneben existieren Hinweise, dass ANG IV über den AT_4 -Rezeptor die Phosphorylierung von Tyrosinresten aktiviert^[156, 240, 241]. Hier sind p68-Paxillin, p125-FAK, MAPK, PI3K, PDK-1, ERK1/2, PKB- α und p70s6K zu nennen^[149, 162, 241].

Zusätzlich wurde die Aktivierung des Kernfaktors NF κ B durch ANG IV in glatten Muskelzellen sowie die Expressionssteigerung proinflammatorischer Gene, wie MCP-1, PAI-1 und TNF α beobachtet. Die NF κ B-Aktivierung konnte durch Phosphotyrosinkinase (PTK)-Inhibitoren wie Herbimycin A aufgehoben werden^[159].

In einer weiteren Studie wurde die Internalisierung von [¹²⁵I] ANG IV beobachtet, so dass sogar direkte intrazelluläre Effekte von ANG IV, wie z.B. die Modulation der Gen-Expression, denkbar sind^[80].

Zusammengefasst werden gewebsspezifische Unterschiede im Signal-Transduktions-Mechanismus des AT_4 -Rezeptors deutlich, die auf eine unbekannte Zahl an AT_4 -Rezeptorsubtypen schließen lassen. Erschwert wird die Klärung dieser Fragestellung durch die Eigenschaft von ANG IV, die Aminopeptidasefunktion der IRAP zu hemmen und so die Eigeneffekte der IRAP-Substrate zu verstärken und zu verlängern. Es muss also die ANG IV-Rezeptorwirkung von der Eigenwirkung der IRAP-Substrate getrennt betrachtet werden. Aus der Literatur abgeleitete mögliche Postrezeptorkaskaden sind in Abbildung 6-1 dargestellt.

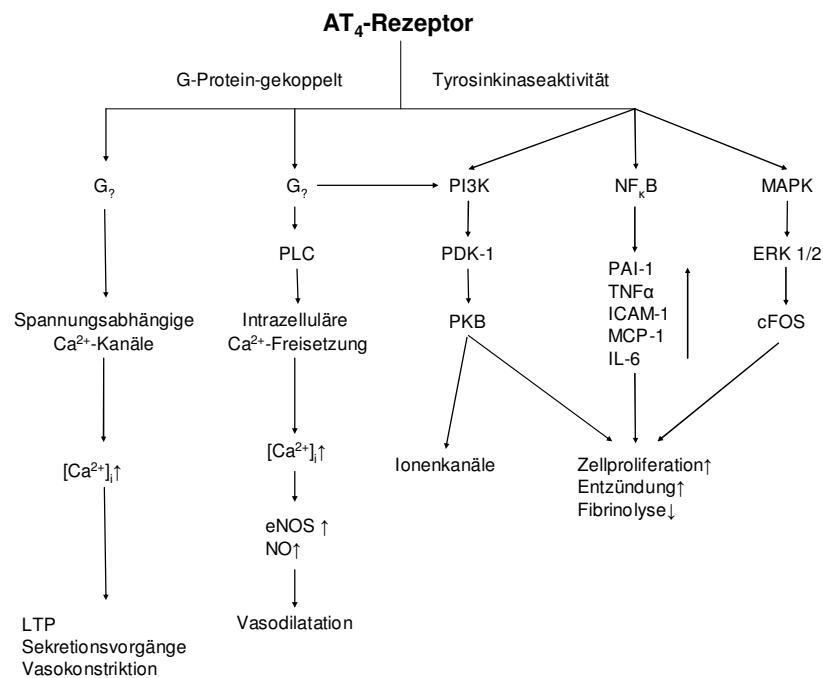


Abbildung 6-1: Mögliche Postrezeptorkaskade des AT₄-Rezeptors (allgemein)

Bedeutung des AT₄-Rezeptors in der β-Zelle

Die pharmakologischen Untersuchungen an der β-Zelllinie INS-1 deuten ebenfalls auf zwei unabhängige Bindungsstellen für das Hexapeptid ANG IV hin.

Die Ergebnisse der ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahmeversuche lassen das Vorhandensein einer hochaffinen Bindungsstelle vermuten. Hier konnte eine maximale extrazelluläre ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme durch eine subnanomolare ANG IV-Konzentration induziert werden. Insgesamt zeigt sich eine glockenförmige Dosis-Wirkungsbeziehung. Diese Ergebnisse stimmen mit den Literaturangaben an anderen Systemen überein. Dulin et al. konnten an Nierenzellen des Opossums eine gesteigerte extrazelluläre Ca²⁺-Aufnahme durch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle nachweisen. Die durch 100 nM ANG IV induzierte Ca²⁺-Aufnahme kann durch Nifedipin und Verapamil gehemmt werden^[239]. Allerdings liegt die ANG IV-Dosis, die eine maximale Ca²⁺-Aufnahme induziert, sehr hoch, um 3 Zehnerpotenzen höher als in den eigenen Versuchen. Auch Davis et al. zeigten an Hippocampuspräparationen der Ratte die Steigerung der extrazellulären Ca²⁺-Aufnahme durch pico- bis nanomolare Konzentrationen Nie-ANG IV sowohl in ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahmeversuchen, als auch in intrazellulären Ca²⁺-Messungen^[176].

Dass die Dosis-Wirkungsbeziehung der ANG IV-induzierten Ca^{2+} -Aufnahme glockenförmig ist wird auch in den Untersuchungen von Handa et al. an humanen und bovinen Nierenzellen deutlich. In der Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass es sich dabei vermutlich nicht um eine Desensibilisierung des AT_4 -Rezeptors handelt, sondern dass ANG IV in höheren Dosen unspezifisch mit anderen Rezeptorsystemen interagiert. Denkbar wäre die bereits beschriebene Bindung am AT_1 -Rezeptor. So zeigten Chansel et al. eine gesteigerte Ca^{2+} -Aufnahme durch mikromolare Konzentrationen von ANG IV, die durch die AT_1 -Rezeptorantagonisten Losartan und Candesartan wieder aufgehoben werden konnten^[238].

Auch in den Untersuchungen von Handa et al. liegt die maximal wirksame ANG IV-Dosis bei ähnlicher Inkubationszeit um 1-2 Zehnerpotenzen höher als in den eigenen Versuchen. Dies deutet darauf hin, dass der AT_4 -Rezeptor an der β -Zelle sensitiver auf ANG IV reagiert als im Nierengewebe.

Interessant sind die Effekte des AT_4 -Rezeptorantagonisten Divalinal. Divalinal zeigt im Gegensatz zu den biphasischen Effekten von ANG IV, eine monophasische, dosisabhängige Steigerung der Ca^{2+} -Aufnahme. Ob dies durch unterschiedliche Affinitäten von Divalinal und ANG IV in höheren Konzentrationen an non- AT_4 -Rezeptoren, wie dem AT_1 -Rezeptor, erklärt werden kann, bleibt offen.

In den eigenen Versuchen kommt es durch Divalinal (1 nM) zu einer geringen Steigerung der Ca^{2+} -Aufnahme. Die ANG IV-induzierte Ca^{2+} -Aufnahme kann aber durch Divalinal antagonisiert werden. Dies deutet darauf hin, dass Divalinal wahrscheinlich ein partieller Agonist / Antagonist am AT_4 -Rezeptor ist.

Die Postrezeptorkaskade, die die Ca^{2+} -Aufnahme über den AT_4 -Rezeptor in die β -Zelle induziert, ist nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. Vermutlich ist der AT_4 -Rezeptor in der β -Zelle jedoch nicht mit einer Tyrosinkinaseaktivität ausgestattet, da keine Tyrosinkinase-induzierten Effekte beobachtet werden konnten. Durch Aktivierung von Phosphotyrosinkinasen (PTK) kommt es zur Aktivierung von NF κ B und somit zur Induktion der PAI-1-Expression. Dieser Effekt, der in glatten Muskelzellen gezeigt werden konnte, tritt in der INS-1 Zelle nicht auf^[159].

Wahrscheinlicher ist ein G-Protein-gekoppelter AT_4 -Rezeptor, dessen Aktivierung cAMP- und cGMP-unabhängig zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle führt^[239].

Eine gesteigerte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration führt in der β -Zelle zu einer Exozytose von Insulingranula. Ob ANG IV die Insulinsekretion durch Steigerung des

intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels beeinflusst, kann in Insulinsekretionsversuchen gezeigt werden.

Die gesteigerte Ca^{2+} -Aufnahme durch ANG IV durch subnanomolare Dosen korreliert nicht mit einer entsprechenden Erhöhung der Insulinsekretion der INS-1 Zelle. ANG IV zeigt nur eine geringe Steigerung der Insulinsekretion und das auch erst in hohen nanomolaren Konzentrationen. Allerdings ist diese geringe Steigerung der Sekretion durch Divalinal antagonisierbar, so dass der schwache Effekt von ANG IV durchaus eine rezeptorspezifische Wirkung darstellen könnte.

Die unterschiedlichen Inkubationszeiten in den Assays (2,5 Minuten; 90 Minuten) könnten die Unterschiede in den Versuchsergebnissen erklären. ANG IV, das eine sehr kurze Halbwertszeit aufweist, könnte im Verlauf der langen Inkubationszeit im Sekretionsassay (90 Minuten) enzymatisch abgebaut und so während der Inkubation einen Teil seiner Wirkung verlieren. Im Ca^{2+} -Assay mit einer sehr kurzen Inkubationszeit von 2,5 Minuten kommt es nach einer Rezeptoraktivierung zur kurzzeitigen Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle. Eine langfristige Stimulation des Rezeptors mit hohen Dosen ANG IV könnte zu einer Desensibilisierung der Rezeptoren führen. Höhere Dosen ANG IV (μM) aktivieren, wie oben erwähnt, auch den AT_1 -Rezeptor, so dass Mischeffekte die Folge wären.

Die Sekretionsversuche mit Nle-ANG IV, dem hydrolysestabilen ANG IV-Analogen, bestätigen diese Theorie. Wie in den Ca^{2+} -Aufnahmeversuchen, erkennt man hier eine glockenförmige Dosis-Wirkungsbeziehung mit einem Wirkmaximum im niedrigen nanomolaren Bereich. Die durch Nle-ANG IV-induzierte Insulinsekretion kann mit Divalinal antagonisiert werden, so dass es sich bei den gezeigten Wirkungen um einen AT_4 -rezeptorspezifischen Effekt handelt.

ANG III, als AT_1 - und AT_4 -Rezeptoragonist, aktiviert unterschiedliche second Messenger, die insgesamt zu einer Inhibition der Insulinsekretion führen.

Aktivierung des AT_4 -Rezeptors der β -Zelle führt durch Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle zu einem kurzzeitigen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Dies beeinflusst in geringem Maße (Steigerung) die Exozytose der Insulingranula.

Beeinflussung der Aminopeptidasefunktion

Die niederaffine Bindungsstelle liegt im hohen nanomolaren Bereich und entspricht vermutlich der Bindung von ANG IV im katalytischen Zentrum der IRAP, wodurch es zu einer Hemmung der Aminopeptidaseaktivität kommt. Vergleicht man K_i -Werte aus

Bindungsstudien mit K_i -Werten aus Enzymassays, wird dies deutlich (siehe Abbildung 6-2). ANG IV zeigt mit einer IC_{50} von 214 nM in den eigenen Untersuchungen an INS-1 Zellen im IRAP-Assay einen ähnlichen K_i -Wert, wie er von Lew et al. an Membranpräparationen von transfizierten HEK293T Zellen gefunden wurde. Auch Weiland et al. konnten an Adipozyten im IRAP-Assay mit einem K_i -Wert von 410 nm diese niederaffine Bindungsstelle charakterisieren. Die hochaffine ANG IV Bindungsstelle konnte in Adipozyten mittels Bindungsstudien nicht nachgewiesen werden^[4]. Dies begründen Weiland et al. damit, dass in den durchgeführten Bindungsstudien auf den Einsatz von Chelatoren, wie EDTA verzichtet wurde. EDTA entfernt das assoziierte Zn^{2+} -Ion der Zink-abhängigen Aminopeptidase IRAP und beeinflusst so die Rezeptoraffinität für ANG IV. Ob die Divergenz der K_i -Werte aus Bindungsstudien und Enzymassays allein durch die unterschiedlichen Versuchbedingungen begründet werden kann, ist unwahrscheinlich (siehe Abbildung 6-2). Die Interaktion an der niederaffinen Bindungsstelle führt vermutlich zu einer Konformationsänderung des katalytischen Zentrums und so zu einer schwachen Hemmung der katalytischen Aktivität von IRAP. Durch die gewählten Versuchsbedingungen ist die hochaffine Bindungsstelle im Enzymassay nicht bzw. nur in den ANG III-Versuchen schwach sichtbar.

Ein weiteres Indiz für zwei unabhängige ANG IV-Bindungsstellen auf dem IRAP-Protein zeigt sich im IRAP-Assay. Divalinal, das viele ANG IV-induzierte Effekte aufhebt, inhibiert ähnlich affin wie ANG IV die katalytische Funktion der IRAP. Diese Inhibition, neben einem möglichen partiellen Agonismus am AT_4 -Rezeptor, erklärt die teilweise ANG IV-ähnlichen Effekte von Divalinal. Die ANG IV-antagonistischen Effekte von Divalinal können eher über eine kompetitive Bindung an der hochaffinen ANG IV-Bindungsstelle erklärt werden.

	K_i Bindungsstudie (nM)	K_i Enzymassay (nM)
Nle-ANG IV	1,5	340
ANG IV	16,8	113
LVV-H7	73	845
Divalinal	445	2300

Abbildung 6-2: Vergleich der K_i -Werte in Bindungsstudien und im Enzymassay

Vergleich der unterschiedlichen Rezeptoraffinitäten von AT_4 -Rezeptorliganden in radioaktiven Verdrängungsversuchen und Enzymassay, übernommen aus [124].

Interessant bleibt jedoch, warum ANG III im IRAP-Assay eine mögliche zweite hochaffine Bindungsstelle zeigt, die ANG IV nicht aufweist. Hier scheint eine weitere Bindungsstelle, bzw. scheinen Cofaktoren mit Einfluss auf die IRAP-Aktivität vorzuliegen.

Insgesamt unterstützen diese Beobachtungen die Theorie, dass gewebsspezifisch unterschiedliche AT₄-Rezeptorsubtypen exprimiert werden, von denen einige die hochaffine Bindungsstelle nicht exprimieren.

Beim Vergleich der ANG IV-induzierten Hemmung der IRAP-Aktivität an 3T3-L1 Adipozyten und INS-1 Zellen wird sichtbar (Abbildung 5-16), dass die IRAP-Aktivität der Adipozyten bei ähnlicher IC₅₀ durch ANG IV stärker gehemmt wird (30 % Restaktivität), als die der INS-1 Zellen (60 % Restaktivität). Scheinbar ist die maximale Hemmung der IRAP durch ANG IV gewebsspezifisch und abhängig von der Menge membranständiger IRAP. Denkbar ist auch die Expression gewebespezifischer IRAP-Subtypen, die durch die ANG IV-Bindung unterschiedlich stark inhibiert werden. Die ANG IV-Bindung am AT₄-Rezeptor induziert eine Konformationsänderung der katalytischen Funktion; die Art der Konformationsänderung ist subtypspezifisch und führt zu einer unterschiedlich starken IRAP-Hemmung.

Durch Hemmung der Aminopeptidaseaktivität steigt die Halbwertszeit endogener Substrate und somit auch ihre Wirkdauer. Die bisher bekannten *in vitro*-Substrate der IRAP weisen relativ hohe mikromolare IC₅₀-Werte auf. In den eigenen Versuchen kann nun auch die Hemmung der IRAP-Aktivität durch Insulin

Substrat	IC ₅₀ (µM)
ACTH	2
Bradykinin	6
Somatostatin	4
Substanz P	9
Vasopressin	4

Aus Herbst et al. [128]

Abbildung 6-3: IC₅₀ von IRAP-Substraten

(IC₅₀: 42 µM) an INS-1 und 3T3-L1 Zellen gezeigt werden. Diese Beobachtung widerspricht Untersuchungen von Herbst et. al., die nur eine geringe Hemmung der IRAP-Aktivität durch Insulin und Oxytocin detektieren konnten^[128]. Oxytocin, ein bekanntes Substrat der IRAP, zeigt in diesen Untersuchungen ebenfalls eine starke Hemmung der IRAP-Aktivität (IC₅₀: 0,47 I.E).

Es ist denkbar, dass Insulin, welches in hohen Konzentrationen in der β-Zelle gespeichert vorliegt, intrazellulär die IRAP-Aktivität hemmt, bzw. sogar in IRAP-haltigen Vesikeln prozessiert wird.

In den Blutstrom sezerniertes Insulin könnte an den Zielzellen durch membranständige IRAP ebenfalls katalytisch abgebaut werden. Um diese Theorie zu bestätigen, sind allerdings Untersuchungen notwendig, die die Insulinkonzentration *in vitro* bzw. *in vivo* unter ANG IV-Gabe kontrollieren.

6.1.3 *In vivo*-Effekte von ANG IV

Literaturvergleich

Obwohl vermutet wird, dass ANG IV und Analoga die Glukoseaufnahme durch Beeinflussung der Translokation GLUT4- und IRAP-haltiger Vesikel modulieren, sind bislang keine Studien bekannt, die die Wirkung von ANG IV in Hinblick auf eine Modulation des Blutglukosespiegels untersuchen. Die Studienlage beschränkt sich derzeit auf den Einfluss von IRAP auf die GSV-Translokation.

In 3T3-L1 Adipozyten führte ein IRAP knock-out zu einer Verschlechterung der GSV-Translokation und somit zu einer reduzierten Glukoseaufnahme^[200]. Ähnliches konnten Keller et al. in IRAP knock-out Mäusen beobachten. Die knock-out Tiere zeigten eine verminderte basale sowie Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme^[129]. Insgesamt sank die Expression des GLUT4-Transporters in der Zelle.

Die Insulin-stimulierte Translokation der GSV ist in OLETF Ratten, einem Tiermodell für Typ 2 Diabetes, vermindert. Dies geht einher mit einer verminderten katalytischen Aktivität der IRAP an der Zelloberfläche sowie mit einer verzögerten und reduzierten Glukoseaufnahme^[200]. Bestätigt werden die Ergebnisse durch Untersuchungen an einer Endometriumkarzinom-Zelllinie. Eine IRAP-Überexpression führt hier zu einer erhöhten Glukoseaufnahme und einer gesteigerten Proliferation der Endometriumzellen^[137].

Die hier vorgestellten Daten stellen demnach die ersten Untersuchungen dar, in denen der Effekt von ANG IV auf die Modulation des Blutglukosespiegels am Ganztier gezeigt wird.

Einfluss von ANG IV auf den Blutglukosestoffwechsel

Durch i.v.-Gabe eines ANG IV-Bolus steigt der Blutglukosespiegel im Vergleich zu einer NaCl-Kontrolle signifikant weniger stark an. Der Effekt wird nach einer Versuchsdauer von 15 Minuten deutlich. ANG IV scheint somit die zelluläre Glukoseaufnahme zu steigern. Es ist nicht klar, auf welchem Weg dies geschieht.

Eine mögliche Erklärung besteht in der Vermutung, dass ANG IV die Glukose-induzierte Insulinfreisetzung der β -Zelle steigert. In den Insulinsekretionsversuchen konnte jedoch nur eine geringfügige Steigerung der Insulinsekretion durch ANG IV beobachtet werden, die die hier beobachteten Effekte nicht erklärt. Die Betrachtung der Plasmainsulinspiegel von NaCl- und ANG IV-behandelter Tiere unterstützt diese Feststellung. Die beiden Gruppen weisen nach 5 Minuten eine übereinstimmende initiale Glukose-induzierte Insulinsekretion auf. Der Plasmainsulinspiegel der ANG IV-Gruppe fällt nach 15 Minuten jedoch weniger stark ab als der Plasmainsulinspiegel der Kontrollgruppe. Dies deutet darauf hin, dass ANG IV die Insulinwirkung verlängert.

Dass die ANG IV-Wirkung auf den Blutglukosespiegel erst nach ca. 15 Minuten deutlich wird, könnte einen Hinweis auf den Wirkmechanismus der ANG IV-induzierten Steigerung der zellulären Glukoseaufnahme liefern. Zu Versuchsbeginn kommt es nach Gabe des Glukosebolus innerhalb von 5 Minuten in den β -Zellen zu einer initial gesteigerten Insulinsekretion. Das freigesetzte Insulin führt in insulinsensitiven Geweben zu einer vermehrten Translokation von IRAP an die Plasmamembran, wo innerhalb von 5 Minuten nach der Aktivierung der Insulinrezeptorkaskade die Expression des AT_4 -Rezeptors / IRAP an der Zelloberfläche um 40 % zunimmt^[222]. Die maximale ANG IV-Wirkung wird so erst nach einigen Minuten erreicht, da der AT_4 -Rezeptor im insulinsensitiven Gewebe zunächst an die Plasmamembran translozieren muss.

Die Ergebnisse des IRAP-Assays zeigen, dass Insulin die Aminopeptidaseaktivität in mikromolarer Konzentration *in vitro* inhibiert. Ob die Plasmainsulinkonzentration ausreicht, um auch *in vivo* die IRAP-Aktivität zu hemmen, ist nicht bekannt. Allerdings erhöhen sich die Plasmakonzentrationen des IRAP-Substrats Vasopressin, das in pikomolaren Konzentrationen im Blut vorliegt^[242], in IRAP knock-out Mäusen um den Faktor 2^[145]. Vasopressin weist im IRAP-Assay eine IC_{50} von 4 μ M auf (Abbildung 6-3). So ist es durchaus denkbar, dass Insulin *in vivo* in niedrigeren Konzentrationen als im *in vitro*-Assay ein Substrat der IRAP darstellt. Evtl. sind verschiedene Cofaktoren für die unterschiedlichen *in vitro*- und *in vivo*-Affinitäten der IRAP-Substrate bedeutsam. Ob Insulin durch die membranständige Aminopeptidase metabolisiert und in unwirksame Abbauprodukte umgesetzt wird, bleibt offen.

Der weiteren Klärung bedarf es, ob ANG IV durch Inhibition der Aminopeptidaseaktivität den Abbau von Insulin verzögert und so die Wirkdauer von Insulin verlängert. Dies würde die Wirkung von ANG IV auf den Blutglukosespiegel der Ratte in den gezeigten Versuchen erklären.

6.2 Angiotensin-Metabolismus im endokrinen Pankreas

Literaturvergleich

Untersuchungen über den Metabolismus von Angiotensin Peptiden im endokrinen Pankreas und speziell an der β -Zelle existieren nicht. Vergleichbare Untersuchungen wurden in einer ähnlichen Versuchsanordnung mit einer anschließenden CE-Analytik an 3T3-L1 Adipozyten durchgeführt^[4].

Vielfach kann über die Bildung und den Abbau der Peptide nur spekuliert werden, bzw. anhand der im Pankreas nachgewiesenen Enzyme des Angiotensin-Stoffwechsels, wie Renin oder ACE, indirekt auf die möglicherweise entstehenden Peptide geschlossen werden. In der β -Zelle sind dies (Pro)Renin^[22] und ACE-2^[26], hinzu kommt die Expression von ACE-1 in den Inselzellen^[25,26]. Allerdings ist die Bildung von ANG II aus AGT auch Renin-unabhängig möglich. Hier sind Serin-Proteasen wie Cathepsin G, die Neutrophile Elastase, die strukturell eng mit der Pankreatischen Elastase verwandt ist, und die Proteinase 3, zu nennen^[243, 244]. Möglicherweise sind auch andere zellgebundene Enzyme, wie z.B. Chymasen, Tonin oder tPA, an der Umsetzung von AGT zu ANG II beteiligt^[244-247]. Im Pankreassaft konnte die Spaltung von AGT zu ANG II durch Kallikrein nachgewiesen werden^[248]. Die Existenz von Aminopeptidasen im Pankreas bleibt bis auf den Nachweis der APA, die ANG II zu ANG III umsetzt, offen^[249].

Außerdem wurde auch über eine ACE-unabhängige Bildung von ANG II in Pankreaskarzinomen berichtet, wobei das abbauende Enzym nicht weiter charakterisiert wurde^[250].

Bildung und Abbau von ANG II

In den eigenen Versuchen kann die Bildung des pharmakologisch wichtigsten Mediators des RAS nachgewiesen werden. ANG II wird über ANG I aus AGT, das in den δ -Zellen gebildet und sezerniert wird^[26], durch membranständige Enzyme der β -Zelllinie INS-1 gebildet. Allerdings lassen die geringe relative Intensität und das Massenspektrum von ANG I als auch von ANG II vermuten, dass in der INS-1 Zelllinie die Renin-, wie auch die ACE-1-Aktivität, als eher gering eingestuft werden kann. Dieses Ergebnis entspricht den bislang bekannten Studien, worin die β -Zelle Renin aus dem Interstitium aufnimmt und die endogene Reninbildung nur schwach

ausgeprägt ist^[40, 41]. ACE-1 wurde in der β -Zelle nicht nachgewiesen. Wie schon in der Methodenkritik erwähnt, existieren jedoch verschiedene alternative Abbauewege, durch die aus AGT ANG II entstehen kann. Um nachzuweisen, ob es sich um einen Renin-abhängigen AGT-Abbau handelt, müssten die Versuche mit einem Renin-Inhibitor, wie Aliskiren, durchgeführt werden. Der ACE-abhängige Abbau von ANG I könnte durch Einsatz spezifischer ACE-Inhibitoren überprüft werden.

Neben ANG I kann auch ein carboxyterminales Abbauprodukt ANG 5-14 sowie das N-terminale Abbauprodukt ANG 2-14 nachgewiesen werden. Ob diese bisher nicht in der Literatur genannten AGT-Abbauprodukte eine pharmakologische Aktivität an den Rezeptoren des RAS zeigen, muss noch geklärt werden.

Der carboxyterminale Abbau von ANG I durch ACE-2, welches C-terminal ANG I spaltet^[251] und in der β -Zelle exprimiert wird^[45], scheint sich durch die große Menge an entstehendem ANG 1-9 zu bestätigen.

Auch die Neutrale Endopeptidase (NEP, Neprilysin) konnte im Pankreas nachgewiesen werden^[252, 253]. Sie gehört zu der Klasse der Zink-abhängigen Metalloproteasen und spaltet unter anderem auch ANG I zu ANG 1-7 und ANG 1-9 zu ANG 1-6^[254]. Die NEP ist vermutlich für die Bildung von ANG 1-7 und ANG 1-6 verantwortlich. Beide Peptide entstehen in relativ großer Menge. Die Umsetzung von ANG 1-7 erfolgt im Vergleich zu dem Abbau von ANG IV und ANG II verlangsamt^[19], so dass ANG 1-7 im Vergleich zu den anderen Peptiden kumuliert. Das Heptapeptid beeinflusst die β -Zellfunktion daher vermutlich nur wenig, da seine Konzentration in der Umgebung der β -Zelle nicht streng reguliert wird.

Die Bildung von ANG 1-7 spielt beim Abbau von ANG II keine Rolle. Hier entsteht ANG 1-7 nur in Spuren. Der Nachweis der spezifischen Bindungsstelle im Pankreas für ANG 1-7, dem Mas-Rezeptor, ist nicht gelungen.

ANG II wird vermutlich über die APA, die im Pankreas nachgewiesen wurde, zu ANG III umgesetzt^[249, 255].

In der Tabelle 5-2 sind weitere Abbauprodukte aufgeführt, die durch C-terminalen und N-terminalen Abbau durch nicht weiter charakterisierte Carboxy- und Aminopeptidasen entstehen. Ihre Aktivität an den Rezeptoren des RAS ist nicht bekannt.

Bildung und Abbau von ANG IV

ANG IV entsteht durch den N-terminalen Abbau über die APN aus ANG III^[84]. Die Aminopeptidase ist im Pankreas nicht nachgewiesen. Aus 100 μM ANG III entstehen in 4 Stunden nur ca. 3 % ANG IV (siehe Abbildung 5-12). Dies zeigt, dass sowohl die ANG IV-Bildung, als auch der Abbau durch Aminopeptidasen, zu denen auch die IRAP gehört^[124], an der β -Zelloberfläche streng reguliert werden, um die para- bzw. autokrine Wirkung von ANG IV zeitlich zu begrenzen. An der Niere und im Fettgewebe ergibt sich ein ähnliches Bild für den ANG IV-Metabolismus^[4, 19]. Die ANG IV-Halbwertszeit in der Niere beträgt lediglich 8 Sekunden^[19]. Auffällig ist, dass ANG II in der β -Zelle nur N-terminal abgebaut werden kann. Dies liegt vermutlich an der AS Phenylalanin in Position 8, die den C-terminalen Abbau inhibiert. Es scheint also, dass ANG 1-7 nur direkt aus ANG I, über Endopeptidasen oder aus ANG 1-9 gebildet werden kann.

Neben dem Nachweis des AT_4 -Rezeptors / IRAP konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ANG IV, als endogener Agonist des Rezeptors, durch Aminopeptidasen in der β -Zellmembran gebildet werden kann und vermutlich in niedrigen subnanomolaren Konzentrationen auf auto- bzw. parakrinem Wege wirkt.

Zusammenfassung

Die hier gezeigten Untersuchungen zum Metabolismus der Angiotensin Peptide an der β -Zelllinie INS-1 zeigen, dass im endokrinen Pankreas durch membranständige Enzyme der β -Zelle alle derzeit bekannten, pharmakologisch aktiven Angiotensin Peptide gebildet werden können. Ausgehend von AGT, das aus der δ -Zelle sezerniert wird, entstehen vermutlich Renin- und ACE-1-unabhängig ANG I, ANG II und ANG 1-7, als auch ANG III und IV.

Diese Entdeckung unterstützt die Existenz eines RAS des endokrinen Pankreas mit auto- und parakrinen Effekten auf die Funktionen der Langerhans-Inseln. Neben den bereits nachgewiesenen Komponenten, wie z.B. dem AT_1 -Rezeptor, vervollständigen diese Ergebnisse das Bild eines lokalen RAS des endokrinen Pankreas auf Peptidebene.

7 Zusammenfassung

7.1 Ergebnisse

- Die β -Zelllinie INS-1 exprimiert den AT_4 -Rezeptor.
- Der GLUT4-Transporter wird von der INS-1 Zelle nicht exprimiert.
- Der AT_4 -Rezeptor ist größtenteils intrazellulär, in kernnahen Regionen vesikulär gespeichert.
- IRAP-haltige Vesikel translozieren konstitutiv zwischen dem kernnahen Speicherkompartiment und der Zellmembran und verschmelzen hier mit ihr. Der AT_4 -Rezeptor befindet sich somit auch so an der Zelloberfläche
- Durch die Erhöhung des endosomalen pH-Werts mittels Bafilomycin A_1 kann die kernnahe Speicherung der IRAP-haltigen Vesikel aufgehoben werden. Die Vesikel verteilen sich über den gesamten Intrazellularraum, ohne mit der Plasmamembran zu verschmelzen. Auch die Insulinsekretion ist durch den Anstieg des endosomalen pH-Werts vermindert.
- ANG IV stimuliert in subnanomolaren Konzentrationen signifikant die extrazelluläre Ca^{2+} -Aufnahme der β -Zelllinie INS-1, dabei zeigt sich eine glockenförmige Dosis-Wirkungsbeziehung. Divalinal hebt die ANG IV-induzierte Steigerung der extrazellulären Ca^{2+} -Aufnahme auf, zeigt dabei jedoch partiell agonistische Eigenschaften.
- Nle-ANG IV erhöht in nanomolarer Konzentration zum Teil signifikant die Insulinsekretion der INS-1 Zelle, wobei sich eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungsbeziehung zeigt. ANG IV zeigt nur eine geringe Steigerung der Insulinsekretion. Divalinal hebt die Effekte von Nle-ANG IV und ANG IV auf.
- ANG IV-Stimulation führt in der INS-1 Zelllinie, anders als in 3T3-L1 Adipozyten, nicht zu einer gesteigerten PAI-1-Expression.
- ANG IV inhibiert die Aminopeptidaseaktivität der IRAP in INS-1 Zellen und 3T3-L1 Adipozyten in unterschiedlichem Ausmaß.
- ANG III zeigt im IRAP-Assay einen biphasischen Kurvenverlauf.
- Insulin und Oxytocin hemmen die Aminopeptidaseaktivität der IRAP in INS-1 Zellen und 3T3-L1 Adipozyten.

- In *in vivo*-Untersuchungen kommt es nach einer Glukosebolusgabe unter ANG IV zu einer Absenkung der Blutglukosespiegel. Der Plasmainsulinspiegel ist gleichzeitig erhöht.
- Die β -Zelllinie INS-1 ist aktiv an der Metabolisierung von Angiotensin Peptiden beteiligt. Die vorliegenden Abbaumechanismen sind sehr komplex.
- Die Reninaktivität der INS-1 Zelle ist gering, da aus AGT nur Spuren ANG I gebildet werden.
- ANG III und ANG IV werden aus ANG II gebildet. Sie werden, anders als ANG 1-7 sehr schnell metabolisiert. Ihre Konzentration wird im Fettgewebe streng reguliert.
- Hauptabbauprodukt von ANG I ist ANG 1-7, das über ANG 1-9 gebildet wird.

7.2 Schlussfolgerung und Arbeitshypothesen

Die in dieser Dissertation gezeigten Ergebnisse erweitern die Kenntnisse über das Angiotensin-System des endokrinen Pankreas. Durch membranständige Enzyme ist die β -Zelle in der Lage, neben den Haupteffektorpeptiden des RAS auch weitere noch nicht ausreichend charakterisierte Angiotensin Peptide zu generieren.

Die folgenden Schlussfolgerungen ergeben sich aus den gezeigten Ergebnissen:

- Der AT_4 -Rezeptor ist Bestandteil eines lokalen RAS des endokrinen Pankreas und dürfte auch in einem intrazellulären RAS der β -Zelle eine größere Bedeutung besitzen.
- Die IRAP-haltigen Vesikel der β -Zelle unterscheiden sich von den insulinempfindlichen GSV in der Fettzelle.
- Der AT_4 -Rezeptor / IRAP trägt vermutlich zur intrazellulären Prozessierung und Reifung von Proteinen bei.
- Aktivierung des Rezeptors durch AT_4 -Agonisten führt zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle und zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels. Der erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel hat eine gesteigerte Insulinsekretion zur Folge.
- ANG IV zeigt ein glockenförmiges Dosis-Wirkungsprofil, in subnanomolaren bis nanomolaren Konzentrationen wirkt es selektiv an AT_4 -Rezeptoren, in mikromolaren Konzentration auch am AT_1 -Rezeptor.

- Die ANG IV-Wirkung ist zeitlich eng begrenzt, da die ANG IV-Konzentration an der β -Zelle streng kontrolliert wird.
- Insulin ist ein mögliches IRAP-Substrat. ANG IV, als IRAP-Inhibitor, hemmt den Insulinabbau und verlängert so die systemische Insulinwirkung. Die Insulinfreisetzung ist in *in vivo*-Versuchen nicht verändert.
- Stabile IRAP-Inhibitoren, wie Nle-ANG IV, sind interessante antidiabetische Substanzen.

8 Abbildungsverzeichnis

	Titel	Seite
Abbildung 1-1	Aufbau des systemischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sowie dessen Regulationsmechanismen	1
Abbildung 1-2	Fließschema des Angiotensin-Metabolismus	5
Abbildung 1-3	Zelltypen des endokrinen Pankreas und ihre sezernierten Hormone	7
Abbildung 1-4	Bestandteile des pankreatischen RAS	9
Abbildung 1-5	Physiologische und pathophysiologische Funktionen des exokrinen pankreatischen RAS	10
Abbildung 1-6	Nachgewiesene Komponenten eines RAS innerhalb der Langerhans-Inseln	12
Abbildung 1-7	Die physiologische Rolle des endokrinen pankreatischen RAS	14
Abbildung 1-8	Komponenten des intrazellulären RAS und deren mögliche physiologische Bedeutung	17
Abbildung 1-9	Die Familie der Zink-abhängigen Aminopeptidasen, dargestellt mit Substrat und spezifischem Inhibitor der Aminopeptidasefunktion	20
Abbildung 1-10	Synonyme für die Insulin regulierte Aminopeptidase (IRAP)	26
Abbildung 1-11	Schematische Darstellung der IRAP-Struktur	28
Abbildung 1-12	Schematische Darstellung der Insulin-induzierten Translokation von IRAP und GLUT4-haltigen Vesikeln an die Plasmamembran	29
Abbildung 1-13 A und B	ANG IV-induzierte Effekte	38-39
Abbildung 2-1	IRAP-GFP Plasmid	47
Abbildung 4-1	Stabil transfizierte INS-1 Zellen mit dem Insert IRAP-GFP	59
Abbildung 4-2	Größenvergleich einer GFP-transfizierten INS-1 Zelle	66
Abbildung 4-3	Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskops	67
Abbildung 4-4	Linsensystem eines konfokalen Mikroskops	67
Abbildung 4-5	Katalytische Umsetzung von Leu-NA zu 2-Amino-Naphthalin	70
Abbildung 4-6	Nachweisreaktion zur Blutglukosebestimmung	72
Abbildung 4-7	Darstellung der Ionisierung durch ESI	73
Abbildung 4-8	Kalibriergerade von ANG IV in Matrixpuffer	75
Abbildung 5-1	IRAP-Western Blot using INS-1 und 3T3-L1 Zellen	85
Abbildung 5-2	GLUT4-Western Blot using INS-1 und 3T3-L1 Zellen	85
Abbildung 5-3	Overlay-Darstellung aus Transmissions- und Fluoreszenzaufnahme einer transient transfizierten INS-1 Zellkultur	86
Abbildung 5-4	Transiente Transfektion von INS-1 Zellen mit den Plasmiden GFP pcDNA3 und IRAP-GFP pcDNA3	87
Abbildung 5-5	Fluoreszenzaufnahme stabil transfizierter INS-1 Zellen	88
Abbildung 5-6	Methodenfunktionalität der Ca ²⁺ -Aufnahmeversuche	89

	Titel	Seite
Abbildung 5-7	Wirkung von ANG IV auf die 5,6 mM Glukose-induzierte Ca ²⁺ -Aufnahme	90
Abbildung 5-8	Wirkung von Divalinal auf die ANG IV-induzierte Steigerung der 5,6 mM Glukose-induzierten Ca ²⁺ -Aufnahme	91
Abbildung 5-9	Effekt von Nle-ANG IV auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion bei INS-1 Zellen	92
Abbildung 5-10	Effekt von ANG IV auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion bei INS-1 Zellen	93
Abbildung 5-11	Effekt von ANG III auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion bei INS-1 Zellen	94
Abbildung 5-12	Effekt von Bafilomycin A ₁ auf die Glukose-stimulierte Insulinsekretion bei INS-1 Zellen	95
Abbildung 5-13	ANG IV-induzierte PAI-1 mRNA-Expression in 3T3-L1 Adipozyten	96
Abbildung 5-14	Einfluss von ANG IV auf die PAI-1 mRNA-Expression an INS-1 Zellen	97
Abbildung 5-15	Vorversuche zur Bestimmung der IRAP-Aktivität	98
Abbildung 5-16	Inhibition der Aminopeptidaseaktivität durch ANG IV an 3T3-L1 Adipozyten und INS-1 Zellen	99
Abbildung 5-17	Inhibition der Aminopeptidaseaktivität durch Angiotensin Peptide	100
Abbildung 5-18	IC ₅₀ -Werte der Angiotensin Peptide im IRAP-Assay	100
Abbildung 5-19	Regression der Messwerte von ANG III mit einer und zwei Bindungsstellen	101
Abbildung 5-20	Hemmung der IRAP-Aktivität durch Insulin an 3T3-L1 Adipozyten und INS-1 Zellen	102
Abbildung 5-21	Hemmung der IRAP-Aktivität durch Oxytocin und PP an 3T3-L1 Adipozyten und INS-1 Zellen	103
Abbildung 5-22	Urethan-induzierter Blutglukoseanstieg bei Wistar-Ratten	105
Abbildung 5-23	Effekt von ANG IV auf den Blutglukosespiegel nach GTT	106
Abbildung 5-24	Urethan-induzierte Änderung des Plasmainsulinspiegels	108
Abbildung 5-25	Effekt von ANG IV auf den Plasmainsulinspiegel nach GTT	108
Abbildung 5-26	Abbau von 100 µM Angiotensinogen durch INS-1 Zellen über 4 Stunden. (Gezeigt wird ein repräsentatives Massenspektrum)	111
Abbildung 5-27	Abbau von 100 µM ANG I durch INS-1 Zellen über 2 Stunden. (Gezeigt wird ein repräsentatives Massenspektrum)	113
Abbildung 5-28	Abbau von 100 µM ANG II durch INS-1 Zellen über 2 Stunden. (Gezeigt wird ein repräsentatives Massenspektrum)	115
Abbildung 5-29	Bildung von ANG IV aus (1) ANG II (100 µM) und (2) ANG III (100 µM) durch INS-1 Zellen	118
Abbildung 5-30	Abbau des Hexapeptids ANG IV (10 µM)	119
Abbildung 6-1	Mögliche Postrezeptorkaskaden des AT ₄ -Rezeptors (allgemein)	129
Abbildung 6-2	Vergleich der K _i -Werte in Bindungsstudien und Enzymassay	132
Abbildung 6-3	IC ₅₀ von IRAP-Substraten	133

9 Literaturverzeichnis

1. Peach, M.J., *Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action*. *Physiol Rev*, 1977. **57**(2): p. 313-70.
2. Wolf, G., U. Butzmann, and U.O. Wenzel, *The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology*. *Nephron Physiol*, 2003. **93**(1): p. P3-13.
3. Lewis, E.J., et al., *The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy*. *The Collaborative Study Group*. *N Engl J Med*, 1993. **329**(20): p. 1456-62.
4. Weiland, *Angiotensin-Rezeptoren und Peptide als Bestandteile eines parakrinen Angiotensin-Systems im Fettgewebe*. Dissertation, 2005.
5. Wensing J., *Pharmakologische Untersuchungen Zum Einfluss von Angiotensin II auf die Insulinsekretion an der Insulinomazelllinie INS-1*. Dissertation, 2008.
6. Saris, J.J., et al., *Prorenin-induced myocyte proliferation: no role for intracellular angiotensin II*. *Hypertension*, 2002. **39**(2 Pt 2): p. 573-7.
7. Peters, J., et al., *Functional significance of prorenin internalization in the rat heart*. *Circ Res*, 2002. **90**(10): p. 1135-41.
8. Takahashi, S., et al., *Human renin-binding protein is the enzyme N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase*. *J Biochem*, 1999. **125**(2): p. 348-53.
9. 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.
10. 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.
11. Feldt, S., et al., *Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide*. *Hypertension*, 2008. **51**(3): p. 682-8.
12. Schefe, J.H., et al., *A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein*. *Circ Res*, 2006. **99**(12): p. 1355-66.
13. Nguyen, G., et al., *Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen*. *Kidney Int*, 1996. **50**(6): p. 1897-903.
14. 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.
15. Sakata, K., et al., *Effects of a long-term pharmacological interruption of the renin-angiotensin system on the fibrinolytic system in essential hypertension*. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2002. **32**(2): p. 67-75.
16. 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.
17. 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*. *Life Sci*, 1993. **52**(18): p. 1461-80.
18. Kirchheim, H.R., *Our fragmentary knowledge of the regulatory functions of ANG II "fragments": are we beginning to see the light?* *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. **285**(5): p. R937-8.
19. Handa, R.K., *Metabolism alters the selectivity of angiotensin-(1-7) receptor ligands for angiotensin receptors*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(8): p. 1377-86.
20. 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.
21. Aspinwall, C.A., et al., *Effects of intravesicular H⁺ and extracellular H⁺ and Zn²⁺ on insulin secretion in pancreatic beta cells*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(50): p. 31308-14.

22. Paul, M., J. Wagner, and V.J. Dzau, *Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction.* J Clin Invest, 1993. **91**(5): p. 2058-64.
23. Leung, P.S. and M.C. Chappell, *A local pancreatic renin-angiotensin system: endocrine and exocrine roles.* Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(6): p. 838-46.
24. Carlsson, P.O., *The renin-angiotensin system in the endocrine pancreas.* Jop, 2001. **2**(1): p. 26-32.
25. 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.
26. Regoli, M., et al., *Angiotensinogen localization and secretion in the rat pancreas.* J Endocrinol, 2003. **179**(1): p. 81-9.
27. 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.
28. Cohen, M., et al., *Effects of ligands or substrate of insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) on trophoblast invasion.* J Pept Sci, 2008.
29. Chappell, M.C., et al., *Evidence for an intrinsic angiotensin system in the canine pancreas.* J Hypertens, 1991. **9**(8): p. 751-9.
30. 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.
31. 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.
32. Chappell, M.C., D.I. Diz, and P.E. Gallagher, *The renin-angiotensin system and the exocrine pancreas.* Jop, 2001. **2**(1): p. 33-9.
33. 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.
34. Howard-McNatt, M. and A.S. Fink, *Captopril inhibits secretin-induced pancreatic bicarbonate output.* J Surg Res, 2002. **103**(1): p. 96-9.
35. Cheung, W.T., et al., *Characterization of a functional AT1A angiotensin receptor in pancreatoma AR4-2J cells.* Peptides, 1999. **20**(7): p. 829-36.
36. Leung, P.S., W.P. Chan, and R. Nobiling, *Regulated expression of pancreatic renin-angiotensin system in experimental pancreatitis.* Mol Cell Endocrinol, 2000. **166**(2): p. 121-8.
37. Chan, Y.C. and P.S. Leung, *AT1 receptor antagonism ameliorates acute pancreatitis-associated pulmonary injury.* Regul Pept, 2006. **134**(1): p. 46-53.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. Tahmasebi, M., et al., *The tissue renin-angiotensin system in human pancreas.* J Endocrinol, 1999. **161**(2): p. 317-22.
42. Dzau, V.J., *Tissue renin-angiotensin system: physiologic and pharmacologic implications. Introduction.* Circulation, 1988. **77**(6 Pt 2): p. I1-3.
43. Sealey, J.E., et al., *Specific prorenin/renin binding (ProBP). Identification and characterization of a novel membrane site.* Am J Hypertens, 1996. **9**(5): p. 491-502.
44. 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.
45. Tikellis, C., et al., *Identification of angiotensin converting enzyme 2 in the rodent retina.* Curr Eye Res, 2004. **29**(6): p. 419-27.

46. Kobayashi, H., et al., *Expression of glucose transporter 4 in the human pancreatic islet of Langerhans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **314**(4): p. 1121-5.
47. Brasier, A.R., et al., *Novel expression of the angiotensinogen gene in a rat pancreatic islet cell line. Transcriptional regulation by glucocorticoids*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(34): p. 16148-54.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. Gletsu, N., et al., *Angiotensin II-induced hypertension in mice caused an increase in insulin secretion*. *Vascul Pharmacol*, 2005. **42**(3): p. 83-92.
56. Koerker, D.J., C.J. Goodner, and W. Ruch, *Letter: Somatostatin action on pancreas*. *N Engl J Med*, 1974. **291**(5): p. 262-3.
57. Jaiswal, N., et al., *Characterization of angiotensin receptors mediating prostaglandin synthesis in C6 glioma cells*. *Am J Physiol*, 1991. **260**(5 Pt 2): p. R1000-6.
58. Robertson, R.P., *Dominance of cyclooxygenase-2 in the regulation of pancreatic islet prostaglandin synthesis*. *Diabetes*, 1998. **47**(9): p. 1379-83.
59. 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.
60. Reinehr, R., et al., *Effects of angiotensin II on rat pancreatic stellate cells*. *Pancreas*, 2004. **28**(2): p. 129-37.
61. Amaya, K., et al., *Angiotensin II activates MAP kinase and NF-kappaB through angiotensin II type I receptor in human pancreatic cancer cells*. *Int J Oncol*, 2004. **25**(4): p. 849-56.
62. Zhang, S.L., et al., *Molecular mechanisms of glucose action on angiotensinogen gene expression in rat proximal tubular cells*. *Kidney Int*, 1999. **55**(2): p. 454-64.
63. Morris, A.D., et al., *ACE inhibitor use is associated with hospitalization for severe hypoglycemia in patients with diabetes. DARTS/MEMO Collaboration. Diabetes Audit and Research in Tayside, Scotland. Medicines Monitoring Unit*. *Diabetes Care*, 1997. **20**(9): p. 1363-7.
64. Miller, J.A., *Impact of hyperglycemia on the renin-angiotensin system in early human type 1 diabetes mellitus*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(8): p. 1778-85.
65. Jandeleit-Dahm, K. and M.E. Cooper, *Hypertension and diabetes: role of the renin-angiotensin system*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2006. **35**(3): p. 469-90, vii.
66. 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.
67. Gimenez-Roqueplo, A.P., et al., *Role of N-glycosylation in human angiotensinogen*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(33): p. 21232-8.
68. Sherrod, M., et al., *Nuclear localization of angiotensinogen in astrocytes*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. **288**(2): p. R539-46.

69. Lavoie, J.L., et al., *Evidence supporting a functional role for intracellular renin in the brain*. Hypertension, 2006. **47**(3): p. 461-6.
70. Clausmeyer, S., et al., *Tissue-specific expression of a rat renin transcript lacking the coding sequence for the prefragment and its stimulation by myocardial infarction*. Endocrinology, 2000. **141**(8): p. 2963-70.
71. Camargo de Andrade, M.C., et al., *Expression and localization of N-domain ANG I-converting enzymes in mesangial cells in culture from spontaneously hypertensive rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(2): p. F364-75.
72. Miyazaki, M. and S. Takai, *Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase*. J Pharmacol Sci, 2006. **100**(5): p. 391-7.
73. Belova, L.A., *Angiotensin II-generating enzymes*. Biochemistry (Mosc), 2000. **65**(12): p. 1337-45.
74. Singh, V.P., et al., *High-glucose-induced regulation of intracellular ANG II synthesis and nuclear redistribution in cardiac myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(2): p. H939-48.
75. Eberhardt, W., et al., *Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach*. Pharmacol Ther, 2007. **114**(1): p. 56-73.
76. Filipeanu, C.M., et al., *Intracellular Angiotensin II and cell growth of vascular smooth muscle cells*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(7): p. 1590-6.
77. Vidotti, D.B., et al., *High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(6): p. F1039-45.
78. Ichihara, A., Y. Kaneshiro, and F. Suzuki, *Prorenin receptor blockers: effects on cardiovascular complications of diabetes and hypertension*. Expert Opin Investig Drugs, 2006. **15**(10): p. 1137-9.
79. Frustaci, A., et al., *Myocardial cell death in human diabetes*. Circ Res, 2000. **87**(12): p. 1123-32.
80. Briand, S.I., W. Neugebauer, and G. Guillemette, *Agonist-dependent AT(4) receptor internalization in bovine aortic endothelial cells*. J Cell Biochem, 1999. **75**(4): p. 587-97.
81. Hooper, N.M., *Families of zinc metalloproteases*. FEBS Lett, 1994. **354**(1): p. 1-6.
82. Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, *Evolutionary families of peptidases*. Biochem J, 1993. **290 (Pt 1)**: p. 205-18.
83. Diaz-Perales, A., et al., *Identification of human aminopeptidase O, a novel metalloprotease with structural similarity to aminopeptidase B and leukotriene A4 hydrolase*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 14310-7.
84. Zini, S., et al., *Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11968-73.
85. Migaud, M., et al., *The in vivo metabolism of cholecystokinin (CCK-8) is essentially ensured by aminopeptidase A*. Peptides, 1996. **17**(4): p. 601-7.
86. Reaux, A., et al., *Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13415-20.
87. Olsen, J., et al., *Complete amino acid sequence of human intestinal aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA*. FEBS Lett, 1988. **238**(2): p. 307-14.
88. Chansel, D., et al., *Characterization of angiotensin IV-degrading enzymes and receptors on rat mesangial cells*. Am J Physiol, 1998. **275**(4 Pt 2): p. F535-42.
89. Lendeckel, U., et al., *Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation*. Biochem J, 1996. **319 (Pt 3)**: p. 817-21.
90. Lendeckel, U., et al., *Synergistic action of DPIV and APN in the regulation of T cell function*. Adv Exp Med Biol, 2003. **524**: p. 123-31.
91. Saiki, I., et al., *Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation*. Int J Cancer, 1993. **54**(1): p. 137-43.
92. Haeggstrom, J.Z., *Structure, function, and regulation of leukotriene A4 hydrolase*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 2): p. S25-31.

93. Griffin, K.J., et al., *Opioid peptides are substrates for the bifunctional enzyme LTA4 hydrolase/aminopeptidase*. Prostaglandins, 1992. **44**(3): p. 251-7.
94. Belhacene, N., et al., *Characterization and purification of T lymphocyte aminopeptidase B: a putative marker of T cell activation*. Eur J Immunol, 1993. **23**(8): p. 1948-55.
95. Foulon, T., S. Cadel, and P. Cohen, *Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6)*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(7): p. 747-50.
96. Gluschkof, P. and P. Cohen, *Proteolytic enzymes in the post-translational processing of polypeptide hormone precursors*. Neurochem Res, 1987. **12**(10): p. 951-8.
97. Balogh, A., et al., *Aminopeptidase B: a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells*. J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 2)**: p. 161-9.
98. Dalle, S., et al., *Miniglucagon (glucagon 19-29), a potent and efficient inhibitor of secretagogue-induced insulin release through a Ca²⁺ pathway*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10869-76.
99. Hattori, A., et al., *Characterization of recombinant human adipocyte-derived leucine aminopeptidase expressed in Chinese hamster ovary cells*. J Biochem (Tokyo), 2000. **128**(5): p. 755-62.
100. Cui, X., et al., *Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding*. J Clin Invest, 2002. **110**(4): p. 515-26.
101. Roelse, J., et al., *Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1591-7.
102. Tanioka, T., et al., *Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases*. J Biol Chem, 2003. **278**(34): p. 32275-83.
103. Constam, D.B., et al., *Puromycin-sensitive aminopeptidase. Sequence analysis, expression, and functional characterization*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26931-9.
104. McLellan, S., et al., *Studies on the tissue distribution of the puromycin-sensitive enkephalin-degrading aminopeptidases*. J Neurochem, 1988. **51**(5): p. 1552-9.
105. Ulrich, C. and L.B. Hersh, *Degradation of alpha and beta neo-endorphin by rat brain membrane peptidases*. Peptides, 1985. **6**(3): p. 475-82.
106. Safavi, A. and L.B. Hersh, *Degradation of dynorphin-related peptides by the puromycin-sensitive aminopeptidase and aminopeptidase M*. J Neurochem, 1995. **65**(1): p. 389-95.
107. Hui, M., et al., *Changes in puromycin-sensitive aminopeptidases in postmortem schizophrenic brain regions*. Neurochem Int, 1995. **27**(4-5): p. 433-41.
108. Stoltze, L., et al., *The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing*. Immunol Today, 2000. **21**(7): p. 317-9.
109. Kandror, K.V. and P.F. Pilch, *gp160, a tissue-specific marker for insulin-activated glucose transport*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8017-21.
110. Tsujimoto, M., et al., *Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase*. Arch Biochem Biophys, 1992. **292**(2): p. 388-92.
111. Rogi, T., et al., *Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase. A new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 56-61.
112. Keller, S.R., et al., *Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles*. J Biol Chem, 1995. **270**(40): p. 23612-8.
113. Katagiri, H., et al., *Acyl-coenzyme A dehydrogenases are localized on GLUT4-containing vesicles via association with insulin-regulated aminopeptidase in a manner dependent on its dileucine motif*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(5): p. 1049-59.
114. Tojo, H., et al., *The Formin family protein, formin homolog overexpressed in spleen, interacts with the insulin-responsive aminopeptidase and profilin Ila*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(7): p. 1216-29.

115. Hosaka, T., et al., *p115 Interacts with the GLUT4 vesicle protein, IRAP, and plays a critical role in insulin-stimulated GLUT4 translocation*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(6): p. 2882-90.
116. Chi, N.W. and H.F. Lodish, *Tankyrase is a golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38437-44.
117. Waters, S.B., et al., *The amino terminus of insulin-responsive aminopeptidase causes Glut4 translocation in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(37): p. 23323-7.
118. Sleeman, M.W., et al., *Association of acyl-CoA synthetase-1 with GLUT4-containing vesicles*. J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3132-5.
119. Boden, G., et al., *Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake*. J Clin Invest, 1994. **93**(6): p. 2438-46.
120. Tordjman, K., et al., *PPARalpha suppresses insulin secretion and induces UCP2 in insulinoma cells*. J Lipid Res, 2002. **43**(6): p. 936-43.
121. 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.
122. Caron, A.Z., G. Arguin, and G. Guillemette, *Angiotensin IV interacts with a juxtamembrane site on AT(4)/IRAP suggesting an allosteric mechanism of enzyme modulation*. Regul Pept, 2003. **113**(1-3): p. 9-15.
123. Greenland, K., B. Wyse, and C. Sernia, *Identification and characterization of angiotensinIV binding sites in rat neurone and astrocyte cell cultures*. J Neuroendocrinol, 1996. **8**(9): p. 687-93.
124. 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.
125. Ye, S., et al., *Insulin-regulated aminopeptidase: analysis of peptide substrate and inhibitor binding to the catalytic domain*. Biol Chem, 2007. **388**(4): p. 399-403.
126. 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.
127. Yamahara, N., et al., *Placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in maternal serum and placenta during normal pregnancy*. Life Sci, 2000. **66**(15): p. 1401-10.
128. Herbst, J.J., et al., *Insulin stimulates cell surface aminopeptidase activity toward vasopressin in adipocytes*. Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 1): p. E600-6.
129. Keller, S.R., A.C. Davis, and K.B. Clairmont, *Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels but maintain normal glucose homeostasis*. J Biol Chem, 2002. **277**(20): p. 17677-86.
130. Maianu, L., S.R. Keller, and W.T. Garvey, *Adipocytes exhibit abnormal subcellular distribution and translocation of vesicles containing glucose transporter 4 and insulin-regulated aminopeptidase in type 2 diabetes mellitus: implications regarding defects in vesicle trafficking*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(11): p. 5450-6.
131. Keller, S.R., *Role of the insulin-regulated aminopeptidase IRAP in insulin action and diabetes*. Biol Pharm Bull, 2004. **27**(6): p. 761-4.
132. Chai, S.Y., et al., *The angiotensin IV/AT4 receptor*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(21): p. 2728-37.
133. Yamamoto, E., et al., *Ikaros is expressed in human extravillous trophoblasts and involved in their migration and invasion*. Mol Hum Reprod, 2005. **11**(11): p. 825-31.
134. Nomura, S., et al., *Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1751**(1): p. 19-25.
135. Kozaki, H., et al., *Maternal serum placental leucine aminopeptidase (P-LAP)/oxytocinase and preterm delivery*. Int J Gynaecol Obstet, 2001. **73**(3): p. 207-13.
136. Mizutani, S. and Y. Tomoda, *Effects of placental proteases on maternal and fetal blood pressure in normal pregnancy and preeclampsia*. Am J Hypertens, 1996. **9**(6): p. 591-7.

137. Shibata, K., et al., *P-LAP/IRAP-induced cell proliferation and glucose uptake in endometrial carcinoma cells via insulin receptor signaling*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 15.
138. Kobayashi, H., et al., [*The significance of serum leucine aminopeptidase (P-LAP) determination in the gynecological malignancies*]. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, 1985. **37**(5): p. 696-702.
139. Ino, K., et al., *Regulatory role of membrane-bound peptidases in the progression of gynecologic malignancies*. Biol Chem, 2004. **385**(8): p. 683-90.
140. Pilar Carrera, M., et al., *Insulin-regulated aminopeptidase/placental leucil Aminopeptidase (IRAP/P-IAP) and angiotensin IV-forming activities are modified in serum of rats with breast cancer induced by N-methyl-nitrosourea*. Anticancer Res, 2006. **26**(2A): p. 1011-4.
141. Paban, V., et al., *Effects of arginine⁸-vasopressin administered at different times in the learning of an appetitive visual discriminative task in mice*. Behav Brain Res, 1997. **87**(2): p. 149-57.
142. Cacabelos, R., et al., *Antagonistic effects of growth hormone-releasing factor and somatostatin on brain histamine*. Endocrinology, 1988. **122**(4): p. 1269-76.
143. Itoh, S., G. Katsuura, and A. Takashima, *Interactions of cholecystokinin, beta-endorphin, and their antagonists on passive avoidance behavior in rats*. Can J Physiol Pharmacol, 1987. **65**(11): p. 2260-4.
144. Matsumoto, H., et al., *Characterization of a recombinant soluble form of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase expressed in Chinese hamster ovary cells*. Eur J Biochem, 2000. **267**(1): p. 46-52.
145. Wallis, M.G., M.F. Lankford, and S.R. Keller, *Vasopressin is a physiological substrate for the insulin-regulated aminopeptidase IRAP*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007.
146. Krishnan, R., et al., *Structure-binding studies of the adrenal AT₄ receptor: analysis of position two- and three-modified angiotensin IV analogs*. Peptides, 1999. **20**(8): p. 915-20.
147. Sardinia, M.F., et al., *AT₄ receptor structure-binding relationship: N-terminal-modified angiotensin IV analogues*. Peptides, 1994. **15**(8): p. 1399-406.
148. Krebs, L.T., et al., *Characterization of the binding properties and physiological action of divalinal-angiotensin IV, a putative AT₄ receptor antagonist*. Regul Pept, 1996. **67**(2): p. 123-30.
149. Handa, R.K., *Characterization and signaling of the AT₄ receptor in human proximal tubule epithelial (HK-2) cells*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(3): p. 440-9.
150. Handa, R.K., J.W. Harding, and S.M. Simasko, *Characterization and function of the bovine kidney epithelial angiotensin receptor subtype 4 using angiotensin IV and divalinal angiotensin IV as receptor ligands*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **291**(3): p. 1242-9.
151. Moeller, I., et al., *Haemorphin peptides may be endogenous ligands for brain angiotensin AT₄ receptors*. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl, 1998. **25**: p. S68-71.
152. Cohen, M., I. Fruitier-Arnaudin, and J.M. Piot, *Hemorphins: substrates and/or inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Hemorphins N-terminus sequence influence on the interaction between hemorphins and DPPIV*. Biochimie, 2004. **86**(1): p. 31-7.
153. Hamilton, T.A., et al., *A role for the angiotensin IV/AT₄ system in mediating natriuresis in the rat*. Peptides, 2001. **22**(6): p. 935-44.
154. Handa, R.K., *Angiotensin-(1-7) can interact with the rat proximal tubule AT₄ receptor system*. Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 2): p. F75-83.
155. Faure, S., et al., *Vasoconstrictive effect of angiotensin IV in isolated rat basilar artery independent of AT₁ and AT₂ receptors*. J Vasc Res, 2006. **43**(1): p. 19-26.
156. Chen, S., J.M. Patel, and E.R. Block, *Angiotensin IV-mediated pulmonary artery vasorelaxation is due to endothelial intracellular calcium release*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(5): p. L849-56.
157. Patel, J.M., et al., *Angiotensin IV receptor-mediated activation of lung endothelial NOS is associated with vasorelaxation*. Am J Physiol, 1998. **275**(6 Pt 1): p. L1061-8.

158. Patel, J.M., et al., *Increased expression of calreticulin is linked to ANG IV-mediated activation of lung endothelial NOS*. Am J Physiol, 1999. **277**(4 Pt 1): p. L794-801.
159. Esteban, V., et al., *Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2005. **96**(9): p. 965-73.
160. 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.
161. Wang, L., M. Eberhard, and P. Erne, *Stimulation of DNA and RNA synthesis in cultured rabbit cardiac fibroblasts by angiotensin IV*. Clin Sci (Lond), 1995. **88**(5): p. 557-62.
162. Li, Y.D., E.R. Block, and J.M. Patel, *Activation of multiple signaling modules is critical in angiotensin IV-induced lung endothelial cell proliferation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(4): p. L707-16.
163. Wright, J.W., et al., *Ethanol-induced suppression of LTP can be attenuated with an angiotensin IV analog*. Regul Pept, 2003. **113**(1-3): p. 49-56.
164. Braszko, J.J., *Involvement of D1 dopamine receptors in the cognitive effects of angiotensin IV and des-Phe6 angiotensin IV*. Peptides, 2004. **25**(7): p. 1195-203.
165. Braszko, J.J., et al., *Angiotensin II-(3-8)-hexapeptide affects motor activity, performance of passive avoidance and a conditioned avoidance response in rats*. Neuroscience, 1988. **27**(3): p. 777-83.
166. Braszko, J.J., *D2 dopamine receptor blockade prevents cognitive effects of Ang IV and des-Phe6 Ang IV*. Physiol Behav, 2006. **88**(1-2): p. 152-9.
167. Wright, J.W., et al., *Angiotensin II(3-8) (ANG IV) hippocampal binding: potential role in the facilitation of memory*. Brain Res Bull, 1993. **32**(5): p. 497-502.
168. Tchekalarova, J., T. Kambourova, and V. Georgiev, *Interaction between angiotensin IV and adenosine A(1) receptor related drugs in passive avoidance conditioning in rats*. Behav Brain Res, 2001. **123**(1): p. 113-6.
169. Pederson, E.S., et al., *A role for the angiotensin AT4 receptor subtype in overcoming scopolamine-induced spatial memory deficits*. Regul Pept, 2001. **102**(2-3): p. 147-56.
170. Lee, J., et al., *Effect of I.C.V. injection of AT4 receptor ligands, NLE1-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats*. Neuroscience, 2004. **124**(2): p. 341-9.
171. Lee, J., et al., *Potentiation of cholinergic transmission in the rat hippocampus by angiotensin IV and LVV-hemorphin-7*. Neuropharmacology, 2001. **40**(4): p. 618-23.
172. Albiston, A.L., et al., *Attenuation of scopolamine-induced learning deficits by LVV-hemorphin-7 in rats in the passive avoidance and water maze paradigms*. Behav Brain Res, 2004. **154**(1): p. 239-43.
173. 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.
174. Tchekalarova, J., et al., *Up-regulation of adenosine A1 receptor binding in pentylenetetrazol kindling in mice: effects of angiotensin IV*. Brain Res, 2005. **1032**(1-2): p. 94-103.
175. Chai, S.Y., et al., *Distribution of angiotensin IV binding sites (AT4 receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualised by in vitro receptor autoradiography*. J Chem Neuroanat, 2000. **20**(3-4): p. 339-48.
176. Davis, C.J., et al., *AT4 receptor activation increases intracellular calcium influx and induces a non-N-methyl-D-aspartate dependent form of long-term potentiation*. Neuroscience, 2006. **137**(4): p. 1369-79.
177. 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.
178. Kramar, E.A., et al., *Role of nitric oxide in angiotensin IV-induced increases in cerebral blood flow*. Regul Pept, 1998. **74**(2-3): p. 185-92.

179. Faure, S., et al., *Cerebroprotective effect of angiotensin IV in experimental ischemic stroke in the rat mediated by AT(4) receptors*. J Physiol Pharmacol, 2006. **57**(3): p. 329-42.
180. Albiston, A.L., et al., *Alzheimer's, angiotensin IV and an aminopeptidase*. Biol Pharm Bull, 2004. **27**(6): p. 765-7.
181. Fink, H., et al., *Major biological actions of CCK--a critical evaluation of research findings*. Exp Brain Res, 1998. **123**(1-2): p. 77-83.
182. Dauge, V. and I. Lena, *CCK in anxiety and cognitive processes*. Neurosci Biobehav Rev, 1998. **22**(6): p. 815-25.
183. Huston, J.P., et al., *Modulation of memory, reinforcement and anxiety parameters by intra-amygdala injection of cholecystokinin-fragments Boc-CCK-4 and CCK-8s*. Peptides, 1998. **19**(1): p. 27-37.
184. 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.
185. Dluzen, D.E., et al., *The effects of infusion of arginine vasopressin, oxytocin, or their antagonists into the olfactory bulb upon social recognition responses in male rats*. Peptides, 1998. **19**(6): p. 999-1005.
186. Gesualdo, L., et al., *Angiotensin IV stimulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in proximal tubular epithelial cells*. Kidney Int, 1999. **56**(2): p. 461-70.
187. Alessi, M.C., et al., *Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease*. Diabetes, 1997. **46**(5): p. 860-7.
188. Birgel, M., et al., *Role of cytokines in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in newly differentiated subcutaneous human adipocytes*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(6): p. 1682-7.
189. Asfari, M., et al., *Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines*. Endocrinology, 1992. **130**(1): p. 167-78.
190. Rüsing D., V.J., *Diadenosinpolyphosphate und P1-Rezeptorliganden: Einfluss auf den Lipid-, Glukose- und Insulinstoffwechsel in vitro und in vivo (Ratte)*. 2005.
191. Green, H. and M. Meuth, *An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture*. Cell, 1974. **3**(2): p. 127-33.
192. Ducluzeau, P.H., et al., *Functional consequence of targeting protein kinase B/Akt to GLUT4 vesicles*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 14): p. 2857-66.
193. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
194. Töpfer M., V.E.J., *Einfluss von Adenosinrezeptor Agonisten (A₁) und -Antagonisten (A₁, A_{2B}) auf die Insulinsekretion, den ⁸⁶Rb⁺-Efflux und ⁴⁵Ca²⁺-Influx von INS-1 Zellen*. Dissertation, 2006.
195. Takeuchi, Y., et al., *Expression of plasminogen activators and their inhibitors in human pancreatic carcinoma: immunohistochemical study*. Am J Gastroenterol, 1993. **88**(11): p. 1928-33.
196. Kerins, D.M., Q. Hao, and D.E. Vaughan, *Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2515-20.
197. Bernal-Mizrachi, E., et al., *Activation of nuclear factor-kappaB by depolarization and Ca(2+) influx in MIN6 insulinoma cells*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 3**: p. S484-8.
198. Kim, E.K., et al., *Coptidis rhizoma extract protects against cytokine-induced death of pancreatic beta-cells through suppression of NF-kappaB activation*. Exp Mol Med, 2007. **39**(2): p. 149-59.
199. Skurk, T., Y.M. Lee, and H. Hauner, *Angiotensin II and its metabolites stimulate PAI-1 protein release from human adipocytes in primary culture*. Hypertension, 2001. **37**(5): p. 1336-40.
200. Takeuchi, M., et al., *Impaired insulin-regulated membrane aminopeptidase translocation to the plasma membrane in adipocytes of Otsuka Long Evans Tokushima Fatty rats*. Nagoya J Med Sci, 2006. **68**(3-4): p. 155-63.

201. Aisaka, K., et al., *Effect of yohimbine on urethane-induced hyperglycemia in rats*. Jpn J Pharmacol, 1989. **49**(4): p. 523-7.
202. Wang, M.Y., et al., *Urethane-induced hyperglycemia*. Acta Pharmacol Sin, 2000. **21**(3): p. 271-5.
203. Gard, P.R., et al., *Interactions of angiotensin IV and oxytocin on behaviour in mice*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2007. **8**(3): p. 133-8.
204. Naveri, L., C. Stromberg, and J.M. Saavedra, *Angiotensin IV reverses the acute cerebral blood flow reduction after experimental subarachnoid hemorrhage in the rat*. J Cereb Blood Flow Metab, 1994. **14**(6): p. 1096-9.
205. Schling, P. and T. Schafer, *Human adipose tissue cells keep tight control on the angiotensin II levels in their vicinity*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48066-75.
206. 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.
207. Werner, G., et al., *Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity*. J Antibiot (Tokyo), 1984. **37**(2): p. 110-7.
208. Chinni, S.R. and A. Shisheva, *Arrest of endosome acidification by bafilomycin A1 mimics insulin action on GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes*. Biochem J, 1999. **339** (Pt 3): p. 599-606.
209. Paolisso, G., et al., *Oxytocin increases arginine-induced A and B cell secretion in normal man and in diabetic subjects*. Diabete Metab, 1988. **14**(2): p. 104-7.
210. Kobayashi, H., et al., *Tissue distribution of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during mouse pregnancy*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(1): p. 113-21.
211. Kulkarni, R.N., et al., *Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines*. J Clin Invest, 1999. **104**(12): p. R69-75.
212. Verspohl, E.J., D. Schenzle, and H.P. Ammon, *Properties of the insulin receptor of rat pancreatic islet*. Biochim Biophys Acta, 1982. **716**(2): p. 258-65.
213. Verspohl, E.J., et al., *In vitro effect of exogenous insulin on insulin secretion. Studies with glucose, leucine, arginine, aminophylline and tolbutamide*. Acta Diabetol Lat, 1982. **19**(4): p. 303-17.
214. Verspohl, E.J., B. Tollkuhn, and H. Kloss, *Role of tyrosine kinase in insulin release in an insulin secreting cell line (INS-1)*. Cell Signal, 1995. **7**(5): p. 505-12.
215. Thoidis, G. and K.V. Kandror, *A Glut4-vesicle marker protein, insulin-responsive aminopeptidase, is localized in a novel vesicular compartment in PC12 cells*. Traffic, 2001. **2**(8): p. 577-87.
216. Gu, H., et al., *Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting*. Science, 1994. **265**(5168): p. 103-6.
217. Kulkarni, R.N., et al., *Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes*. Cell, 1999. **96**(3): p. 329-39.
218. YE, S., *Molecular Characterisation of Insulin-Regulated Aminopeptidase (IRAP)*. 2006.
219. Malide, D., et al., *Vp165 and GLUT4 share similar vesicle pools along their trafficking pathways in rat adipose cells*. FEBS Lett, 1997. **409**(3): p. 461-8.
220. Karylowski, O., et al., *GLUT4 is retained by an intracellular cycle of vesicle formation and fusion with endosomes*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): p. 870-82.
221. Ross, S.A., S.R. Keller, and G.E. Lienhard, *Increased intracellular sequestration of the insulin-regulated aminopeptidase upon differentiation of 3T3-L1 cells*. Biochem J, 1998. **330** (Pt 2): p. 1003-8.
222. Ross, S.A., et al., *Trafficking kinetics of the insulin-regulated membrane aminopeptidase in 3T3-L1 adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **239**(1): p. 247-51.

223. Subtil, A., et al., *Characterization of the insulin-regulated endocytic recycling mechanism in 3T3-L1 adipocytes using a novel reporter molecule*. J Biol Chem, 2000. **275**(7): p. 4787-95.
224. Aledo, J.C., et al., *Identification and characterization of two distinct intracellular GLUT4 pools in rat skeletal muscle: evidence for an endosomal and an insulin-sensitive GLUT4 compartment*. Biochem J, 1997. **325 (Pt 3)**: p. 727-32.
225. Johnson, A.O., M.A. Lampson, and T.E. McGraw, *A di-leucine sequence and a cluster of acidic amino acids are required for dynamic retention in the endosomal recycling compartment of fibroblasts*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(2): p. 367-81.
226. Hou, J.C., et al., *A specific dileucine motif is required for the GGA-dependent entry of newly synthesized insulin-responsive aminopeptidase into the insulin-responsive compartment*. J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33457-66.
227. Keller, S.R., *The insulin-regulated aminopeptidase: a companion and regulator of GLUT4*. Front Biosci, 2003. **8**: p. s410-20.
228. Peck, G.R., et al., *Interaction of the Akt substrate, AS160, with the glucose transporter 4 vesicle marker protein, insulin-regulated aminopeptidase*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(10): p. 2576-83.
229. Thorens, B. and J. Roth, *Intracellular targeting of GLUT4 in transfected insulinoma cells: evidence for association with constitutively recycling vesicles distinct from synaptophysin and insulin vesicles*. J Cell Sci, 1996. **109 (Pt 6)**: p. 1311-23.
230. Hettiarachchi, K.D., P.Z. Zimmet, and M.A. Myers, *The plecomacrolide vacuolar-ATPase inhibitor bafilomycin, alters insulin signaling in MIN6 beta-cells*. Cell Biol Toxicol, 2006. **22**(3): p. 169-81.
231. 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.
232. Roberts, K.A., et al., *Autoradiographic identification of brain angiotensin IV binding sites and differential c-Fos expression following intracerebroventricular injection of angiotensin II and IV in rats*. Brain Res, 1995. **682**(1-2): p. 13-21.
233. Ptasinska-Wnuk, D., J. Kunert-Radek, and M. Pawlikowski, *Angiotensins II and IV stimulate the rat anterior pituitary cell proliferation independently of the AT1 receptor subtype*. Neuro Endocrinol Lett, 2003. **24**(6): p. 397-400.
234. Hall, K.L., et al., *Identification and characterization of a novel angiotensin binding site in cultured vascular smooth muscle cells that is specific for the hexapeptide (3-8) fragment of angiotensin II, angiotensin IV*. Regul Pept, 1993. **44**(2): p. 225-32.
235. Wyse, B., K. Greenland, and C. Sernia, *Specific binding sites for (3-8)angiotensin in C6 glioma cells*. Brain Res, 1995. **681**(1-2): p. 41-6.
236. Wang, L., et al., *A specific binding site for angiotensin II(3-8), angiotensin IV, in rabbit cardiac fibroblasts*. J Recept Signal Transduct Res, 1995. **15**(1-4): p. 517-27.
237. Shipp, M.A. and A.T. Look, *Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key!* Blood, 1993. **82**(4): p. 1052-70.
238. Chansel, D., et al., *Effects of angiotensin IV and angiotensin-(1-7) on basal and angiotensin II-stimulated cytosolic Ca²⁺ in mesangial cells*. Eur J Pharmacol, 2001. **414**(2-3): p. 165-75.
239. Dulin, N., et al., *Angiotensin IV receptors and signaling in opossum kidney cells*. Am J Physiol, 1995. **269**(5 Pt 2): p. F644-52.
240. Thomas, W.G. and F.A. Mendelsohn, *Angiotensin receptors: form and function and distribution*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(6): p. 774-9.
241. Chen, J.K., et al., *Angiotensin IV induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in proximal tubule cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **280**(6): p. F980-8.
242. Thrasher, T.N. and L.C. Keil, *Arterial baroreceptors control blood pressure and vasopressin responses to hemorrhage in conscious dogs*. Am J Physiol, 1998. **275**(6 Pt 2): p. R1843-57.
243. Ramaha, A. and P.A. Patston, *Release and degradation of angiotensin I and angiotensin II from angiotensinogen by neutrophil serine proteinases*. Arch Biochem Biophys, 2002. **397**(1): p. 77-83.

244. Klickstein, L.B., C.E. Kaempfer, and B.U. Wintroub, *The granulocyte-angiotensin system. Angiotensin I-converting activity of cathepsin G*. J Biol Chem, 1982. **257**(24): p. 15042-6.
245. Urata, H., et al., *Cloning of the gene and cDNA for human heart chymase*. J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17173-9.
246. Schiller, P.W., S. Demassieux, and R. Boucher, *Substrate specificity of tonin from rat submaxillary gland*. Circ Res, 1976. **39**(5): p. 629-32.
247. Baltatu, O., et al., *High levels of human chymase expression in the pineal and pituitary glands*. Brain Res, 1997. **752**(1-2): p. 269-78.
248. Maruta, H. and K. Arakawa, *Confirmation of direct angiotensin formation by kallikrein*. Biochem J, 1983. **213**(1): p. 193-200.
249. Li, L., et al., *Widespread tissue distribution of aminopeptidase A, an evolutionarily conserved ectoenzyme recognized by the BP-1 antibody*. Tissue Antigens, 1993. **42**(5): p. 488-96.
250. Ohta, T., et al., *Angiotensin converting enzyme-independent, local angiotensin II-generation in human pancreatic ductal cancer tissues*. Int J Oncol, 2003. **23**(3): p. 593-8.
251. 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.
252. Erhuma, M., et al., *Expression of neutral endopeptidase (NEP/CD10) on pancreatic tumor cell lines, pancreatitis and pancreatic tumor tissues*. Int J Cancer, 2007. **120**(11): p. 2393-400.
253. Terashima, H., et al., *Identification of neuropeptide-degrading enzymes in the pancreas*. Peptides, 1992. **13**(4): p. 741-8.
254. Skidgel, R.A. and E.G. Erdos, *Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies*. Peptides, 2004. **25**(3): p. 521-5.
255. Rozenfeld, R., et al., *Aminopeptidase A, generating one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, plays a key role in central control of blood pressure*. Proc West Pharmacol Soc, 2003. **46**: p. 39-44.
256. Barrett, A., *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2004

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem "Doktorvater" Herrn Prof. Dr. E. J. Verspohl ganz herzlich für die Überlassung des Promotionsthemas bedanken. Das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit, eigene Fehler machen zu dürfen, hat meine persönliche Entwicklung positiv geprägt.

Dem Arbeitskreis möchte ich für eine großartige Zeit und ein phantastisches Arbeitsklima danken. Ich habe hier viele gute Freunde gefunden, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ihr habt für die richtige Verperlung gesorgt.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. K. H. Klempnauer, der das GFP pcDNA3 Plasmid zur Verfügung gestellt hat, und Prof. Dr. H. J. Galla, der mir die Möglichkeit gab, Real-Time PCR-Messungen durchzuführen sowie das konfokale Laserscanning Mikroskop zu nutzen. Seinem Arbeitskreis danke ich für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Bei Prof. Dr. M. Lehr und Dr. J. Fabian möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, HPLC-MS-Gerät und Fachwissen nutzen zu können. Herr Dr. J. Fabian hat mit seiner Unterstützung maßgeblich zu dem HPLC-MS Daten beigetragen.

Prof. Dr. J. M. Tavaré von der Universität Bristol danke ich für die freundliche Überlassung des IRAP-GFP Plasmid.

Prof. Dr. S. R. Keller von der Universität Virginia hat mir den polyklonalen IRAP-Antikörper zur Verfügung gestellt, wofür ich Ihr herzlich danken möchte.

Meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinen Großeltern möchte ich für die Unterstützung während der letzten Jahre danken. Ihr habt mich in allen Dingen gefördert und meine Ausbildung unermüdlich unterstützt. Ihr habt so einen Großteil zu dieser Arbeit beigetragen.

Meiner Frau Andrea danke ich für die Unterstützung und Ihr Verständnis. Du hast mir geduldig und verständnisvoll zur Seite gestanden und der Arbeit den letzten Feinschliff verpaßt. Ich liebe Dich.

