

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. T.M. Gress
Klinische Forschergruppe für Gastrointestinale Endokrinologie
Leiter: Prof. Dr. med. R. Göke
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg

**Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen
GLP-1 und dem GLP-1 Rezeptor mit Hilfe von
Site-directed Mutagenesis des
GLP-1 Rezeptors und des Glukagon Rezeptors**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anna Fürniß-Ihns
geb. Fürniß
aus Brühl

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps- Universität Marburg am
05.07.2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. R. Göke

Korreferent: PD Dr. H. Garn

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGEN	6
EINLEITUNG	7
A. THERAPIE DES DIABETES MELLITUS TYP 2.....	7
B. DIE ENTWICKLUNG DES INKRETINKONZEPTES.....	8
C. SUCHE NACH WEITEREN INKRETINEN.....	11
D. DIE FAMILIE DER GLUKAGON-VERWANDTEN PEPTIDE UND EVOLUTION DES PROGLUKAGONS.....	13
E. GEWEBE DER PROGLUKAGON EXPRESSION.....	14
1. α -Zellen im Pankreas.....	14
2. Intestinale L-Zellen.....	15
3. Zentrales Nervensystem.....	16
F. PROGLUKAGON.....	17
1. Das Präproglukagon Gen des Menschen.....	17
2. Regulation der Genexpression.....	17
3. Posttranslationale Spaltung von Proglukagon.....	19
G. REGULATION DER GLP-1 SEKRETION IM DARM.....	21
1. nutritive Regulation.....	21
2. endokrine Regulation.....	23
3. neurale Regulation.....	23
H. METABOLISMUS DES GLP-1.....	24
I. PHYSIOLOGISCHE WIRKUNGEN DES GLP-1.....	25
1. Inselzellen des Pankreas.....	25
2. Magen.....	27
3. Lunge.....	27
4. Gehirn.....	28
5. Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse.....	30
6. Schilddrüse.....	30
7. Kardiovaskuläres System.....	31
8. Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe.....	31
J. GLP-1 REZEPTOR.....	32
1. Struktur.....	32
2. Verteilung.....	34
3. Signaltransduktion.....	35
4. Regulation der Rezeptorexpression und -sensitivität.....	36
K. GLP-1 ALS THERAPEUTIKUM FÜR DIABETES MELLITUS.....	38

1. Klinische Studien.....	38
2. Nebenwirkungen.....	39
3. Probleme der Praktikabilität.....	39
L. UNTERSUCHUNGEN DER STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNG ZWISCHEN PEPTID UND REZEPTOR.....	41
FRAGESTELLUNG	44
MATERIAL UND METHODEN	47
A. MATERIAL.....	47
1. Pufferlösungen und Nährmedien.....	47
2. verwendete Oligonukleotide	50
B. METHODEN	52
1. Rekombinante PCR mit Kontrolle durch silent mutation	52
2. Ligation der rekombinanten DNA in den Vektor pTEJ-8 bzw. pcDNA3.1+.....	57
3. Erzeugung kompetenter Bakterien	58
4. Transformation.....	58
5. DNA-Minipräparation ausgewählter Klone und Kontrolle auf silent mutation	59
6. DNA-Maxipräparation	59
7. Sequenzierung der aus der DNA-Mini-bzw. Maxipräparation gewonnenen rekombinanten DNA	60
8. Umklonierung der rekombinanten DNA des GLP-1 Rezeptors der Ratte vom Vektor pTEJ-8 in den Vektor pcDNA3.1+.....	62
9. Transiente Transfektion von COS-7 Zellen mit der rekombinanten DNA und der Wildtyp-DNA	63
10. Synthese von GLP-1- und Glukagon-Analoga.....	64
11. Radioaktive Markierung von GLP-1 und den GLP-1-/Glukagon-Analoga	64
12. Bindungsstudien mit den transient transfizierten COS-7 Zellen	65
13. cAMP Assay.....	66
14. Gesamt-DNA Bestimmung.....	67
15. Umklonieren der DNA vom GLP-1-Rezeptor wild/mut, Glukagon-Rezeptor wild/mut in den Vektor pcDNA3.1/V5-His B	68
16. Membran Präparation für den Western-blot mit Proteinbestimmung nach Bradford	69
17. Western-Blot.....	70
ERGEBNISSE	73
DISKUSSION	81
ZUSAMMENFASSUNG	93
BIBLIOGRAPHIE.....	95
AKADEMISCHE LEHRER	146
DANKSAGUNG.....	147

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aminosäuresequenzvergleich Glukagon-verwandter Peptide mit GLP-1 als Basispeptid	13
Abbildung 2:	Genexpression von Proglukagon und dessen gewebespezifische Verarbeitung	19
Abbildung 3:	Aminosäuresequenzvergleich Klasse B G-Protein-bindender Rezeptoren aus dem Bereich der 2. transmembranären Domäne	44
Abbildung 4:	graphische Darstellung des Versuchskonzepts	46
Abbildung 5:	Rekombinante PCR	54
Abbildung 6:	Aminosäuresequenz von GLP-1 und Glukagon	73
Abbildung 7:	GLP-1 Rezeptor der Ratte mit der durchgeführten Punktmutation am K197	73
Abbildung 8:	Glukagon Rezeptor der Ratte mit der durchgeführten Punktmutation am I195	74
Abbildung 9:	Bindungsaffinität von GLP-1 zum GLP-1 Rezeptor, Glukagon zum Glukagon Rezeptor und [Q]-GLP-1 zum GLP-1 Rezeptor	75
Abbildung 10:	Westernblot	76
Abbildung 11:	cAMP-Produktion der mit dem jeweiligen Rezeptor transfizierten COS7 Zellen bei einer Peptidkonzentration des jeweiligen Peptids von 10^{-8} M	78
Abbildung 12:	cAMP-Produktion der mit GLP-1 Rezeptor transfizierten COS7 Zellen bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen	78
Abbildung 13:	cAMP-Produktion der mit Glukagon Rezeptor transfizierten COS7 Zellen bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen	79
Abbildung 14:	cAMP-Produktion der mit [K195]-Glukagon Rezeptor transfizierten COS7 Zellen bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Bindungsaffinität des jeweiligen Peptids mit dem jeweiligen Rezeptor	75
------------	--	----

Abkürzungen

ACTH	-	adrenocorticotropes Hormon
cDNA	-	copy deoxyribonucleic acid
cAMP	-	cyclic adenosine monophosphate
CAP	-	CREB-assoziertes Protein
CRE	-	cAMP response element
CREB	-	CRE-bindendes Protein
DPP IV	-	Dipeptidyl Peptidase IV
GIP	-	Glukose-abhängiges insulinotropes Polypeptid
GLP	-	glucagon like peptide
GPCR	-	G-protein coupled receptor
GRF	-	growth hormone releasing factor
GRP	-	glucagon-related peptide
GRPP	-	glucagon-related pancreatic peptide
GUE	-	glucagon upstream enhancer
IP	-	intervening peptide
IP ₃	-	Inositol-Triphosphat
ISE	-	intestinal specific promoter element
MCH	-	melanin-concentrating hormone
MPF	-	major proglucagon fragment
mRNA	-	messenger ribonucleic acid
NPY	-	Neuropeptid Y
PACAP	-	pituitary adenylylase-activating polypeptide
PC	-	Prohormon Convertase
PH	-	Parathormon
PHM	-	Peptid Histidin-Methionin
PIP ₂	-	Phosphatidylinositol-Biphosphat
PKA	-	Proteinkinase A
PKC	-	Proteinkinase C
PRP	-	PACAP-related peptide
RT-PCR	-	reverse transcriptase polymerase chain reaction
TSH	-	Thyroidea stimulierendes Hormon
UKPDS	-	United Kingdom Prospective Diabetes Study
VIP	-	vasoaktives intestinales Polypeptid

Einleitung

A. Therapie des Diabetes mellitus Typ 2

Diabetes mellitus und seine Komplikationen stellen ein grosses gesundheitliches Problem in der heutigen Gesellschaft dar. Beispielsweise liegen für die U.S.A. Zahlen vor, die besagen, dass 7,8% der erwachsenen US-amerikanischen Bevölkerung an Diabetes mellitus erkrankt sind (Harris et al. 1998) und dort 12 bis 15% der gesamten Gesundheitskosten für die Behandlung von Diabetes mellitus und seinen Langzeitkomplikationen ausgegeben werden (Jonathan et al. 1995). Zudem ist die Prävalenz innerhalb der letzten 20 Jahre stetig angestiegen.

Die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 steht auf drei Säulen (Chehade et al. 2000):

1. Gewichtsreduktion (Hughes et al. 1984)
2. Steigerung der Insulinverfügbarkeit
3. Senkung des Insulinbedarfs

Die Massnahmen zur Gewichtsreduktion sind aus Gründen der Non-Compliance häufig nicht ausreichend, um eine gute Glukosehomöostase zu erzielen. Daher ist für Säule 2 und 3 fast immer eine medikamentöse Therapie notwendig.

Eine Steigerung der Insulinverfügbarkeit ist direkt erreichbar durch die Gabe von Insulin oder seiner Analoga. Eine indirekte Verbesserung der Insulinverfügbarkeit wird erzielt durch Sulfonylharnstoffe oder Meglitinide, die, ähnlich wie die Sulfonylharnstoffe, den ATP-abhängigen Kaliumkanal der β -Zelle hemmen. Hauptnebenwirkungen dieser Gruppe sind Hypoglykämie und mit Hyperinsulinämie vergesellschaftete Gewichtszunahme (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group 1998a, 1998b, Balfour et al. 1998). 10 bis 15% der Patienten sprechen primär nicht auf eine Therapie mit Sulfonylharnstoffen an und sekundär nimmt diese Zahl um 5 bis 10% jährlich zu (Groop et al. 1986).

Ein gesenkter Insulinbedarf kann entweder durch eine gesteigerte Insulinsensitivität von Leber-, Fett- und Muskelzellen oder durch die gehemmte Verdauung von Kohlehydraten im Darm erzielt werden.

Die Insulinsensitivität kann durch Biguanide und Thiazolidindione gesteigert werden. Letztere sind wegen ihrer Lebertoxizität und kardialen Nebenwirkungen in der Diskussion (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft 2006, The DREAM Trial Investigators 2006, Dromandy et al. 2005). Das Thiazolidindion Troglitazon

wurde aufgrund der Lebertoxizität vom Markt genommen (Gale 2001). Metformin als bestuntersuchtestes Biguanid bewirkt keine Gewichtszunahme (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group 1998b). Es hat aber nur bei Monotherapie kein erhöhtes Hypoglykämierisiko (Bailey et al. 1996), ist dann aber meist wirkungslos bei Patienten, die nicht auf Sulfonylharnstoffe ansprechen. Ausserdem tritt in 9 von 100000 behandelten Personen pro Jahr die schwere Komplikation der Laktatazidose auf, die zum Nierenversagen oder zum Tod führen kann (Stang et al. 1999).

Eine gehemmte Verdauung von Kohlehydraten im Darm wird durch α -Glucosidase-Hemmer wie Acarbose erzielt. Durch Hemmung der α -Glucosidase wird die Aufnahme von Glukose auf den gesamten Darm verteilt. So erzielt man die Abflachung der postprandialen Spitze der Glukosekonzentration im Blut, die für das Fortschreiten der Komplikationen von Diabetes mellitus verantwortlich ist (Mooradian et al. 1999). Da Acarbose aber Nebenwirkungen wie Flatulenz und Diarrhoe hat, ist die Compliance nicht gut (Holeman et al. 1999). Ausserdem sank nach 3 Jahren das HbA1c unter Acarbose nur auf 8,1% im Vergleich zu 8,6% bei Placebo (Holeman et al. 1999).

Da es bisher also keine optimale Therapie für den Diabetes mellitus Typ 2 gibt, wird nach neuen Möglichkeiten gesucht. Neben dem Hormon Amylin, das bei Hyperglykämie parallel zu Insulin aus den β -Zellen des Pankreas ausgeschüttet wird und eine Verlangsamung der Magenentleerung und Hemmung der Glukagonsekretion bewirkt (Shmitz et al. 1997), scheint das Inkretin GLP-1 eine vielversprechende Möglichkeit zu sein.

B. Die Entwicklung des Inkretinkonzeptes

Als Bayliss und Starling 1902 Sekretin entdeckten, postulierten sie ein Signal, das vom Darm aus durch Nahrungsaufnahme eine Antwort des endokrinen Pankreas auslöst und so die Kohlehydratverwertung im Körper beeinflusst (Bayliss und Starling 1902). 1906 beschrieben Moor et al. einen chemischen Extrakt aus dem Duodenum, der die Sekretion im Pankreas fördern sollte, und versuchten, Diabetes mellitus mit Injektionen aus Darmextrakt zu heilen (Moore et al. 1906). Über 20 Jahre später beschäftigten sich Zunz und LaBarre mit diesem Stoff. Mit einem intestinalen Extrakt konnten sie eine Hypoglykämie bei Hunden erzeugen. LaBarre führte den Begriff „Inkretin“ ein, der einen Stoff aus dem Darm beschrieb, der möglicherweise die

endokrine Sekretion des Pankreas fördert (Zunz et al. 1929, LaBarre et al. 1930, LaBarre 1932). Auch andere Autoren beschrieben diesen hypoglykämischen Effekt von duodenalen Extrakten (Dixon et al. 1926, Laughton et al. 1932, Heller,-H 1929, 1935). Dagegen konnten Loew et al. 1940 bei ihren Versuchen mit Hunden und Schweinen diesen Effekt nicht reproduzieren (Loew et al. 1940). Aus den Versuchen von Loew et al., die nur an nüchternen Tieren durchgeführt worden waren, zog man den Schluss, dass es diesen hypoglykämischen Faktor möglicherweise doch nicht gäbe und er geriet in Vergessenheit.

Durch die Entwicklung eines zuverlässigen Radioimmunoassays für Insulin 1960 (Yalow et al. 1960) wurde die Forschung über Inkretin wieder belebt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass nicht nur Glukose allein für die Insulinsekretion im Pankreas verantwortlich sein konnte (McIntyre et al. 1964, Elrick et al. 1964, Arnould et al. 1963, Dupré et al. 1966). Die Gabe von Glukose intrajejunal bewirkte dabei im Vergleich zur intravenösen Gabe trotz niedrigen Glukosespiegels einen stärkeren Anstieg des Insulinspiegels. Perley und Kipnis (Perley et al. 1967) schätzten den Anteil der Wirkung dieses zusätzlichen Faktors auf 50%, indem sie die Insulinspiegel nach intravenöser und nach oraler Glukoseapplikation miteinander verglichen.

Unger und Eisentraut nannten diese Verbindung zwischen Darm und Pankreasinseln 1969 die „enteroinsuläre Achse“ (Unger und Eisentraut 1969). 1979 beschrieb Creutzfeldt diese Achse als einen Weg für neuronale und hormonelle Signale aus dem Darm, die an den Pankreasinseln die Sekretion von Insulin, Glukagon, Somatostatin und Pankreatisches Polypeptid beeinflussen (Creutzfeldt 1979). In diesem Zusammenhang stellte er auch eine Definition für das Inkretin als hormonellen Bestandteil der „enteroinsulären Achse“ auf:

1. Es muss im Gastrointestinaltrakt produziert werden.
2. Es muss nahrungsabhängig, besonders durch Kohlehydrate, sezerniert werden.
3. Es muss bei erhöhtem Blutglukosespiegel die Insulinsekretion fördern.

Das erste Hormon, das eindeutig diese Kriterien erfüllte, war GIP. Ursprünglich wurde GIP als „Enterogastron“ isoliert. Enterogastron wurde ausgeschüttet durch Fett oder Fettabbauprodukte im Dünndarm und bewirkte eine Hemmung der Magensäuresekretion (Kosaka et al. 1930). Erst Ende der sechziger Jahre - bei der Aufreinigung von Cholecystokinin aus Darmpreparationen - isolierten Brown et al.

GIP (Brown et al. 1969, 1970a, 1970b). Da es eine stark hemmende Wirkung auf die Magensäuresekretion hatte, nannten sie es „gastric inhibitory polypeptide“ (Brown 1971, Brown et al. 1971). 1972 beobachteten Rabinovitch und Dupré bei der Aufreinigung von Cholecystinin nicht nur den Verlust der hemmenden Wirkung auf die Magensäuresekretion, sondern auch den Wegfall der insulinotropen Wirkung (Rabinovitch und Duprè 1972). Basierend auf der Annahme, dass GIP eine insulinotrope Wirkung hat, spritzten Dupré et al. Versuchspersonen intravenös gereinigtes GIP des Schweins und Glukose. Es war eine stärkere Insulinsekretion als bei der alleinigen Infusion von Glukose nachweisbar, aber unter Euglykämie hatte GIP keine Wirkung (Dupré et al. 1973). Später wurde die Glukoseabhängigkeit in vivo beim Hund (Pederson et al. 1975), beim Menschen (Elahi et al. 1979) und gleichermaßen im perfundierten Rattenpankreas (Pederson et al. 1976) bestätigt. Es konnte auch mehrfach gezeigt werden, dass die orale Aufnahme von Fett zwar die GIP-Sekretion fördert, aber ohne Glukose dieser Anstieg des GIP-Spiegels nicht zur Sekretion von Insulin führt (Brown 1974, Cleator et al. 1975, Ross et al. 1978). Wegen dieser Glukose-abhängigen Insulinsekretion wurde GIP nun seit 1976 „Glukose-abhängiges insulinotropes Polypeptid“ genannt (Brown et al. 1976).

GIP-immunreaktive Zellen wurden im oberen Dünndarm bei Wiederkäuern (Bunnett et al. 1986), Menschen, Schweinen, Hunden (Buffa et al. 1975) und Ratten (Buchan et al. 1982) nachgewiesen. Bei Hunden und Menschen sind sie vor allem im Duodenum und in geringerer Masse im Jejunum vorhanden (Polak et al. 1982). Bei Mäusen, die entweder Diabetes mellitus Typ 1 oder Typ 2 hatten, konnte in gleichem Masse eine abnehmende Konzentration von GIP-produzierenden Zellen vom Duodenum zum Ileum nachgewiesen werden (Berghofer et al. 1997). Kurz nach oraler Aufnahme von Aminosäuren (Thomas et al. 1976), einer fetthaltigen Mahlzeit (Brown 1974, Cleator et al. 1975, Ross et al. 1978) oder Glukose (Pederson et al. 1975, Kuzio et al. 1974, Morgan 1979a) steigt der GIP-Spiegel im Blut an. Es scheint, dass Glukose direkt an den K-Zellen des Darmes die GIP-Sekretion stimuliert (Kieffer et al. 1994, 1995a).

Ausser Glukose bewirken auch Monosaccharide wie Galaktose und Saccharose die Sekretion von GIP. Fruktose, Mannose und 2-Desoxy-Glukose dagegen fördern die GIP-Freisetzung nicht (Ganda et al. 1979, Morgan et al. 1979b, Falko et al. 1982). Diese Befunde lassen sich dadurch erklären, dass Glukose und Galaktose durch aktiven Na^+ -abhängigen Transport in die Zelle aufgenommen werden, aber es für Fruktose ein Na^+ -unabhängiges Carriersystem (Gray et al. 1975), für Mannose keinen

aktiven Transportweg und für 2-Desoxy-Glukose keine intrazelluläre Metabolisierung gibt (Creutzfeldt et al. 1988). Für die Sekretion von GIP durch Monosaccharide ist aber Voraussetzung, dass diese entweder aktiv in die Zelle transportiert oder intrazellulär metabolisiert werden (Sykes et al. 1980).

Goldberg et al. konnten zeigen, dass Mannose zwar die Sekretion von GIP nicht fördert, aber trotzdem die durch Glukose induzierte Insulinsekretion steigern kann (Goldberg et al. 1980). Untersuchungen, bei denen endogenes GIP durch Antiseren neutralisiert wurde (Ebert et al. 1979, 1982, Lauritsen et al. 1981), ergaben nur eine Hemmung der Insulinantwort auf orale Glukose um 20-50%. Auch die insulinotrope Wirkung von intestinalem Extrakt, der durch Immunoabsorption von GIP gereinigt war, ging nicht völlig verloren (Ebert et al. 1983). Bei Untersuchungen von Patienten mit unterschiedlich ausgeprägten Darmresektionen konnte gezeigt werden, dass ein Grossteil des Inkretineffektes unabhängig von GIP-Spiegel vom distalen Dünndarm auszugehen scheint (Lauritsen et al. 1980). So wurde vermutet, dass es ausser GIP noch weitere Inkretine geben müsste (Ebert et al. 1983).

C. Suche nach weiteren Inkretinen

Verschiedene Darmhormone, unter anderem Cholecystokinin, wurden auf die Kriterien des Inkretinkonzeptes geprüft, konnten diese aber nicht erfüllen (Creutzfeldt 1979, Creutzfeldt et al. 1985, Ensinnck et al 1992.).

Die Entwicklung in der Technologie der rekombinanten DNA Ende der siebziger Jahre ermöglichte 1982 das Klonen von cDNAs, die für die 2 Präproglukagone im Pankreas des Anglerfisches (*Lophius americanus*) kodieren (Lund et al. 1982, 1983). Eines dieser Präproglukagone kodiert für Glukagon und im Anschluss daran für ein damals so genanntes „glucagon-related peptide“ (GRP), das in seiner Aminosäuresequenz dem GIP sehr ähnlich ist. Es wurde vermutet, dass dieses GRP-1 ein Inkretin darstellen könnte. Basierend auf dieser Hypothese konnte im Darm des Anglerfisches ebenfalls mRNA des Präproglukagon nachgewiesen werden, die der mRNA im Pankreas sehr ähnlich ist (Lund et al. 1981). Daraufhin wurden Präproglukagon mRNAs aus menschlichem (Novak et al. 1987) und Rattendarm (Drucker et al. 1989) kloniert, die identisch mit den pankreatischen mRNAs sind.

Nach der Entdeckung des GRP im Anglerfisch wurden auch Präproglukagon cDNAs von Säugern (Heinrich et al., Bell et al. 1983a, Lopez et al. 1983) und das humane Gen

(Bell et al. 1983b) kloniert. Dadurch wurde klar, dass das GRP-1 des Anglerfisches homolog zum humanen „glucagon-like peptide 1“ (GLP-1) ist, das später als Inkretin identifiziert werden konnte (Göke,-R et al. 1988b, 1991 Fehmann et al. 1992b, Orskov 1992a, Göke,-B 1993). Allerdings gab es anfänglich Unklarheiten über die biologisch aktive Form des GLP-1. Da die Familie der Glukagon-verwandten Peptide alle als erste Aminosäure ein Histidin aufweisen und man davon ausging, dass das Enzym bei der Verarbeitung des Proglukagons zu Peptiden zur Erkennung die 2 basischen Aminosäuren Lysin und Arginin vor der Spaltstelle benötigt, synthetisierte man zuerst das GLP-1(1-37). Seine erste Aminosäure war ein Histidin und in der Sequenz des Proglukagons gingen ihm Lysin und Arginin voraus. Doch bei der Untersuchung der biologischen Aktivität konnte bei Hasen keine insulinotrope Wirkung festgestellt werden (Ghiglionne et al. 19984). Auch das GLP-1(1-36)amid bewirkte in der Kultur von Pankreasinseln der Ratte nur bei einer extrem hohen unphysiologischen Konzentration (25 nM) eine ganz geringe Sekretion von Insulin (Schmidt et al. 1985). Erst danach wurde vermutet, dass die am N-Terminus trunkierten Peptide GLP-1(7-37) und GLP-1(7-36)amid möglicherweise die eigentlich aktiven Formen des GLP-1 sind (Schmidt et al. 1985). Man hatte nämlich die grösste Übereinstimmung der Sequenzen mit den anderen Glukagon-verwandten Peptiden feststellen können, wenn man das Histidin an Position 7 des GLP-1(1-37) als die erste Aminosäure des Peptids festlegte (Bell et al. 1983a, Schmidt et al. 1985, Habener et al. 1985). Mojsov et al. zeigten dann 1986, dass vom GLP-1 in den intestinalen L-Zellen wirklich posttranslational die ersten 6 Aminosäuren des N-Terminus abgespalten werden (Drucker et al. 1986, Mojsov et al. 1987). 1987 wurde dann von verschiedenen Gruppen gezeigt, dass dieses trunkierte GLP-1(7-37) beim isoliert perfundierten Rattenpankreas (Mojsov et al. 1987), Schwein (Holst et al. 1987) und Menschen (Kreymann et al. 1987) eine potente insulinotrope Wirkung hat. Weiterhin wurde festgestellt, dass dieses trunkierte GLP-1 anschliessend zum Teil am C-Terminus um die letzte Aminosäure verkürzt und dann amidiert wird, so dass GLP-1(7-36)amid entsteht (Orskov et al. 1987b, 1989, Uttenthal et al. 1985, Kreymann et al. 1988, Mojsov et al. 1990). Beim Menschen macht GLP-1(7-36)amid 80% des zirkulierende GLP-1 aus (Orskov et al. 1994). Bei Hunden findet sich im Blut mehr GLP-1(7-37) als GLP-1(7-36)amid (Pridal et al. 1996). Beim Menschen konnte bisher bei equimolarer Konzentration beider Peptide kein relevanter Unterschied in der Plasmahalbwertszeit oder der Potenz, die Insulinsekretion zu fördern, gefunden werden (Orskov et al. 1993). Auch der hemmende Effekt auf die

Säuresekretion des Magens war bei beiden Formen gleich ausgeprägt (Wettergren et al. 1998a).

D. Die Familie der Glukagon-verwandten Peptide und Evolution des Proglukagons

GLP-1 gehört zu einer Familie von Peptiden, die alle der Sequenz des Glukagon sehr ähnlich sind. Obwohl ihre Aminosäuresequenzen zum Glukagon eine Homologie von 21% bis 48% aufweisen, haben sie doch ganz unterschiedliche Wirkungen, einige sogar als Neurotransmitter. Zu dieser Familie gehören: Glukagon, GLP-1(7-37), GLP-1(7-36)amid, GIP, Exendin-3 und -4, Sekretin, Peptid Histidin-Methionin Amid (PHM), GLP-2, Helospectin-1 und -2, Helodermin, pituitary adenylyclase-activating polypeptide (PACAP)-38 und -27, PACAP-related peptide (PRP), Parathormon (PH), growth hormone releasing factor (GRF) und vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) (Abb.1).

Peptid	7	10	15	20	25	30	35	40	45	50
GLP-1	HAE	GTFTS	DVSSY	LEGQA	AKEFI	AWLVK	GR			amid
Ex-										
endin-4	HGE	GTFTS	DLSKQ	MEEEA	VRLFI	EWLKN	GGPSS	GAPPP	S	amid
GLP-2	HAD	GSFSD	EMNTI	LDNLA	ARDFI	NWLIQ	TKITD	R		
Glu-										
kagon	HSQ	GTFTS	DYSKY	LDSRR	AQDFV	QWLMN	T			
GIP	YAE	GTFIS	DYSIA	MDKIH	QQDFV	NWLLA	QKGKK	NDWKH	NITQ	
VIP	HSD	AVFTD	NYTRL	RKQMA	VKKYL	NSILN	amid			
Sekretin	HSD	GTFTS	ELSRL	RDSAR	LQRLL	QGLV	amid			
PACAP										
-38	HSD	GIFTD	SYSRY	RKQMA	VKKYL	AAVLG	KRYKQ	RVKKNK	amid	
PH	HAD	GVFTS	DFSRL	LGQLS	AKKYL	ESL	amid			
GRF	YAD	AIFTN	SYRKV	LGQLS	ARKLL	QDIMS	RQQGE	SNQER	GARAR	L
										-amid

Abb.1: Aminosäuresequenzvergleich Glukagon-verwandter Peptide mit GLP-1 als Basispeptid (Position 7 des GLP-1 entspricht der Position 1 der anderen Peptide). Konservierte Aminosäuren sind fett hervorgehoben (Adelhorst et al. 1994)

Exendin-3 und -4, Helospectin-1 und -2 und Helodermin wurden aus dem Gift der Echse *Heloderma suspectum* isoliert und haben am exokrinen Pankreas eine hohe sekretorische Potenz (Raufman 1996). Für Exendin-4 konnte auch eine sekretorische Potenz für das endokrine Pankreas nachgewiesen werden (Göke,-R et al. 1993a). Trotzdem scheinen diese 5 Peptide nicht die gleichen evolutionären Wurzeln wie die anderen Peptide der Familie zu haben (Pohl et al. 1998).

Für VIP/PH, PACAP und Glukagon/GLP-1 wurden cDNAs geklont. Es wurde gezeigt, dass für diese Peptide unterschiedliche Gene existieren (Pohl et al. 1998, Chen et al. 1997). Es scheint aber für alle ein Urgen zu geben, das möglicherweise durch Duplikation und Amplifikation zu den verschiedenen Genen geführt hat (Bell 1986). Das gilt ebenso für das Gen des Präproglukagons, das für Glukagon, GLP-1 und GLP-2 kodiert. Lopez et al. behaupten, basierend auf statistischen Analysen von DNA-Sequenzen vom Rind, Menschen, Hamster und Anglerfisch, dass durch Duplikation die 2 Präproglukagon Gene des Anglerfisches entstanden sind (Lopez et al. 1984). Anhand dieser Analyse vermuten sie auch, dass die GLP-2 Sequenz durch Duplikation der Glukagon- oder GLP-1 Sequenz entstanden sein muss. Bis vor einigen Jahren glaubte man, dass GLP-2 in Fischen und Vögeln nicht exprimiert würde (Plisetskaya et al. 1996, Hasegawa et al. 1990). Doch Irving und Wong fanden heraus, dass bei Fischen und Vögeln die Sequenz von GLP-2 zwar nicht im Proglukagon des Pankreas enthalten ist, aber sie konnte im Proglukagon des Darms nachgewiesen werden. Also haben diese Spezies unterschiedliche Präproglukagon mRNAs durch alternatives Splicing (Irwin et al. 1995). Beim Frosch *Xenopus* konnten ausser Glukagon und GLP-2 sogar drei verschiedene Formen von GLP-1 nachgewiesen werden (Irwin et al. 1997). Bei Säugetieren liegt jeweils nur ein Proglukagon vor, und die Aminosäuresequenzen dieser Proglukagone sind stark konserviert. Die Aminosäuresequenzen ihrer Produkte Glukagon und GLP-1 sind sogar im Laufe der Evolution von Tierspezies stark konserviert. GLP-1 ist bei allen bisher untersuchten Säugern identisch (Kieffer et al. 1999). Das lässt darauf schliessen, dass die physiologischen Prozesse, die durch Glukagon und GLP-1 geregelt werden, sehr wichtig sind.

E. Gewebe der Proglukagon Expression

1. α -Zellen im Pankreas

α -Zellen im Pankreas wurden 1907 als sich von β -Zellen der Langerhansinseln unterscheidende Zellen entdeckt (Lane 1907). 1962 wurde nachgewiesen, dass sie Glukagon produzieren (Baum et al. 1962). An einem Mausmodell wurde gezeigt, dass bei der embryonalen Entwicklung der α -Zellen der Transkriptionsfaktor Pax6 essentiell für die Differenzierung ist (St-Onge et al. 1997, Sander et al. 1997). Dieser

Faktor ist auch nach Abschluss der körperlichen Entwicklung essentiell für die Transkription des Präproglukagon- Gens. Dies gilt nicht nur für das Pankreas (St-Onge et al. 1997, Hussain et al. 1999, Sander et al. 1997), sondern auch für den Darm (s.u.) (Hill et al. 1999).

Bei der zellspezifische Verarbeitung von Proglukagon in α -Zellen entsteht hauptsächlich Glukagon (Novak et al. 1987, Drucker et al. 1986, Mojssov et al. 1986, Lee et al. 1990). Trotzdem ist GLP-1 in α -Zellen der Ratte (Heller,-R-S et al. 1995) und des Menschen (Varndell et al. 1985) immunhistochemisch nachweisbar. Orskov et al. konnten durch Stimulation menschlicher α -Zellen durch Arginin selektiv immunhistochemisch das „major pancreatic proglukagon fragment“ (MPGF) nachweisen (Orskov et al. 1991). Es ist Endprodukt der posttranslationalen Verarbeitung von Proglukagon im Pankreas und enthält unter anderem die GLP-1 Sequenz (s.u.). 3 Jahre später fanden sie aber in menschlichem Pankreasextrakt mit Hilfe chromatographischer Techniken und RIAs auch GLP-1(1-36)amid und GLP-1(1-37) (Orskov et al. 1994, Holst et al. 1994). Van Delft et al. fanden so im Pankreasextrakt von Ratten vor allem GLP-1(1-36)amid (van-Delft et al. 1997). Andere Gruppen konnten mit ähnlicher Technik bei Ratten auch biologisch aktives GLP-1(7-36)amid und GLP-1(7-37) nachweisen (Mojssov et al. 1990, Shima et al. 1987). Bei allen Untersuchungen waren die Mengen der gefundenen GLPs sehr gering, aber möglicherweise haben sie Bedeutung für eine parakrine Wirkung in den Inselzellen.

2. Intestinale L-Zellen

Bereits 1961 konnte gezeigt werden, dass intestinale Zellen mit C-terminal-Glukagon-spezifischem Antiserum reagieren, obwohl dieses Reagenz sich chemisch vom Glukagon unterschied (Unger et al. 1961, 1968). Antikörper, die gegen Glicentin gerichtet waren, machten eine grosse Population von endokrinen Zellen im Dün- und Dickdarm sichtbar. Dabei wurden 2 verschiedene Arten von Antikörpern verwendet. Zum einen Antikörper, die gegen den Glukagon-ähnlichen Mittelteil des Glicentins gerichtet sind und zum anderen Antikörper, die mit dem nicht-Glukagon-ähnlichen Anteil des Glicentins reagieren (Grimelius et al. 1976, Polak et al. 1971, Ravazzola et al. 1979). Glicentin ist ebenso wie Oxyntomodulin ein Endprodukt der posttranslationalen Verarbeitung des Proglukagons im Darm (Mojssov et al. 1986) (s.u.). Im Gegensatz zum Pankreas stellen im Darm GLP-1 und GLP-2 den grössten

Teil der Produkte des Proglukagons und sind die Hauptquelle für die zirkulierenden GLPs (Mojsov et al. 1990, Orskov et al. 1994, van-Delft et al. 1997).

Die endokrinen Zellen, die das Proglukagon produzieren, konnten beim Menschen in steigender Konzentration vom Duodenum bis zum Rektum nachgewiesen werden (Berghofer et al. 1997, Eissele et al. 1992, Bryant et al. 1983, Moody 1980, Sjolund et al. 1983). Sie werden als L-Zellen bezeichnet und weisen im Elektronenmikroskop eine Ultrastruktur auf, die sich klar von den α -Zellen im Pankreas unterscheidet (Grimelius et al. 1976, Ravazzola et al. 1979, Orci et al. 1983). Im Jejunum von Hunden sind sie dicht bei den GIP-produzierenden K-Zellen lokalisiert (Damholt et al. 1999a); möglicherweise ein Hinweis auf einen parakrinen Signalweg.

3. Zentrales Nervensystem

Schon bevor GLP-1 als ein eigenständiges Produkt der posttranslationalen Verarbeitung des Proglukagons bekannt war, wurde in verschiedenen Säugetieren, einschliesslich des Menschen, im zentralen Nervensystem Immunreaktivität von darmähnlichem Glukagon nachgewiesen (Conlon et al. 1979, Loren et al. 1979, Tager et al. 1980, Dorn et al. 1983, Inokuchi et al. 1986). Die Entwicklung von spezifischen Antisera ermöglichte die Analyse der genauen anatomischen Verteilung des GLP-1 im ZNS. GLP-1 Immunreaktivität ist im ZNS weit verbreitet. Die grösste Dichte findet sich im Hypothalamus, Thalamus und in der Gegend des Septums, die niedrigste im Cortex und Stammhirn (Shimizu et al. 1987, Jin,-S-L et al. 1988, Drucker et al. 1988, Kreymann et al. 1989, Salazaar et al. 1990, Larsen et al. 1997a).

Chromatographische Untersuchungen von Extrakten aus dem Hypothalamus und Hirnstamm der Ratte zeigten, dass Proglukagon im Gehirn scheinbar wie im Darm verarbeitet wird und so hauptsächlich Oxyntomodulin, Glicentin, GLP-1 und GLP-2 entstehen (van-Delft et al. 1997, Kreymann et al. 1989, Larsen et al. 1997a, Blache et al. 1988, Yoshimoto et al. 1989) (s.u.). Bei Ratten, Affen und Menschen konnten in der Medulla oblongata Nervenzellen nachgewiesen werden, die GLP-1 enthalten (Shimizu et al. 1987, Jin,-S-L et al. 1988, Drucker et al. 1988, Larsen et al. 1997a, Kauth et al. 1987).

Explizit waren diese Zellen im dorsalen und ventralen Teil der Formatio reticularis und im Nucleus tractus solitarius lokalisiert (Jin,-S-L et al. 1988, Larsen et al. 1997a, Rinaman 1999a). Beide Areale sind für die regulierende Weiterleitung von Afferenzen

zuständig; die Formatio reticularis unter anderem für die Regulation der Atmung, des Herzschlags und des Blutdrucks bei körperlicher Arbeit oder seelischer Erregung. Im Nucleus tractus solitarius kommen die sensibelen Nerven des N. vagus und alle Geschmacksafferenzen an. In diesen Zellen konnte auch mit Hilfe von in situ Hybridisierung unter Verwendung von passenden Oligonukletiden Präproglukagon nachgewiesen werden (Drucker et al. 1988, Larsen et al. 1997a, Han et al. 1986, Merchantaler et al. 1999). Diese Zellen scheinen zu verschiedenen Arealen im Gehirn Signale zu schicken. Durch retrograde Markierung konnte gezeigt werden, dass diese Zellen in den Nucleus paraventricularis des Hypothalamus projizieren (Larsen et al. 1997a, Rinaman 1999a).

F. Proglukagon

1. Das Präproglukagon Gen des Menschen

Das Gen hat eine Länge von ca. zehn Kilobasen und befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (White et al. 1986). Es besteht aus sechs Exons, die durch fünf Introns unterbrochen werden (Bell et al. 1983b). Exon 1 und 6 kodieren jeweils den grössten Teil der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen. Exon 2 beinhaltet einen Teil der 5'-untranslatierten Region und das Signalpeptid, das für den gezielten Transport des Proglukagons innerhalb der Zelle benötigt wird. Exon 3, 4 und 5 kodieren jeweils für Glukagon, GLP-1 und GLP-2. Zwischen den Sequenzen dieser Peptide werden die Sequenzen von Glicentin-related pancreatic peptide (GRPP), intervening peptide 1 (IP-1) und intervening peptide 2 (IP-2) translatiert, s. Abb. 2 (Mojsov et al. 1986). Es konnte gezeigt werden, dass beim Menschen die Präproglukagon mRNAs im Darm, Pankreas und Hirn vom gleichen Gen kommen und identisch sind (Novak et al. 1987, Mojsov et al. 1986, Eissele et al. 1992).

2. Regulation der Genexpression

Im menschlichen Körper wird Präproglukagon an drei verschiedenen Orten expremiert: in den α -Zellen des Pankreas, den L-Zellen des Darms und in Zellen des Zentralnervensystems. Die Transkription des Präproglukagongens wird durch einen

Promoter geregelt, eine 2500 Basenpaare lange Sequenz der DNA angrenzend an das 5'-Ende vor dem Startkodon des Gens. Dieser Bereich enthält fünf Kontrollsequenzen á ca. 20-40 Basenpaaren, sogenannte cis-acting Kontrollelemente. Sie werden mit G1, G2, G3, CRE (cAMP response element) und ISE (intestinal specific element) bzw. GUE (glucagon upstream enhancer) (Jin, T et al. 1995) bezeichnet (Habener 1997). An diese DNA Sequenzen binden verschiedene Peptide, die als Transkriptionsfaktoren die Transkription fördern oder hemmen können. Sie werden als trans-acting Kontrollelemente bezeichnet. Auch wenn die Untersuchungen, die an allen Kontrollelementen der Transkription durchgeführt werden, grossen Aufschluss über die Regulation dieser Zellfunktion liefern können, muss grundsätzlich bedacht werden, dass die verwendeten Zellen kultivierte Tumorzellen sind. Durch ihre Immortalität können sie nur bedingt die Realität der Transkription in normalen α - und L-Zellen darstellen.

Das G1 Element scheint α -Zell-spezifisch und G2 und G3 Inselzell-spezifisch die Expression des Präproglukagongens zu regulieren (Philippe et al. 1988). An das G1 Element bindet unter anderem auch der Transkriptionsfaktor Pax6, der so die Expression des Gens fördert (Hussain et al. 1999, Sander et al. 1997). Es wurde aber kürzlich gezeigt, dass Pax6 auch essentiell für die Expression des Gens in der L-Zelle ist und dort an G1 und G3 bindet (Hill et al. 1999). Die Transkription wird in den α -Zellen durch Phorbolster-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) gefördert (Philippe et al. 1987), während in den L-Zellen Phorbolster den Präproglukagon mRNA Spiegel nicht erhöht (Drucker et al. 1989). 1997 wurde gezeigt, dass die Wirkung des Phorbolsters in den α -Zellen über G2 vermittelt wird (Fürstenau et al. 1997). Das G3 Element scheint als negatives „insulin response element“ zu wirken und könnte so für die parakrine, glukagoninhibitorische Wirkung des Insulins verantwortlich sein (Philippe et al. 1995).

Das „cAMP response element“ (CRE) ist für die cAMP-vermittelte Aktivierung der Transkription zuständig (Knepel et al. 1990, Schwaninger et al. 1993). Diese wird durch CRE-bindende Proteine (CREB) vermittelt (Knepel et al. 1990, Schwaninger et al. 1993, Gajic et al. 1993), kann aber auch durch so genannte CREB-assoziierte Proteine (CAP) gehemmt werden (Miller et al. 1993). Die Anwesenheit eines CRE im Promoter des Präproglukagons passt zu dem Nachweis von GLP-1 und GIP Rezeptoren auf den α -Zellen, die in vitro cAMP-abhängig die Glukagonsekretion fördern (Moens et al. 1996, Heller-R-S et al. 1997, Ding et al. 1997).

Schon 1988 konnte gezeigt werden, dass für eine suffiziente Expression des Gens in der α -Zelle und in Neuronen der Promoter ab -1300 bp ausreichend ist. Das gilt aber nicht für die L-Zelle (Efrat et al. 1988). Der Promoter der L-Zelle konnte mangels passenden Tumorzelllinien lange nicht so gut erforscht werden wie der der α -Zelle. Aber mit Hilfe einer L-Zelltumorlinie der Maus konnte ein „intestinal-specific promoter element“ (ISE), auch „glucagon upstream enhancer“ (GUE) genannt, identifiziert werden. Es liegt zwischen 1300 und 2300 Basenpaaren in Richtung $5'$ -Ende vor den Promoterelementen G1, G2, G3 und CRE (Drucker et al. 1994). Jin und Drucker führten dann Versuche an Zelllinien durch, die entweder intestinale Zellen (GLUTag und STC-1) oder α -Zellen (InR1G9) repräsentieren. Bei diesen Untersuchungen fanden sie DNA-bindende Proteine spezifisch für Darm bzw. Pankreas, die mit diesem Teil des Promoters interagieren (Jin, T et al. 1995).

3. Posttranslationale Spaltung von Proglukagon

Als zum ersten Mal die Anordnung der Exone im Präproglukagonen in klar abgrenzbare Untereinheiten entschlüsselt wurde (Bell et al. 1983), vermutete man, dass die unterschiedlichen Produkte in α -Zellen, L-Zellen und Nervenzellen durch alternatives Exonsplicing des gleichen Gens entstehen könnten. So würde eine zellspezifische mRNA entweder für Glukagon oder für GLPs kodieren. In Fröschen, Echsen, Hühnern und Fischen konnte diese Hypothese bestätigt werden. Bei diesen konnten zwei Präproglukagon mRNAs nachgewiesen werden: eine im Pankreas, die für Glukagon und GLP-1 aber nicht für GLP-2 kodiert und eine im Darm, die für alle drei Peptide kodiert (Irwin et al. 1995). In Säugetieren konnte aber nur eine Präproglukagon mRNA in Pankreas, Darm und Gehirn nachgewiesen werden und es wurde gezeigt, dass bei diesen die Zellspezifität auf der Ebene der posttranslationalen Spaltung von Proglukagon stattfindet (Novak et al. 1987, Drucker et al. 1986, Mojssov et al. 1986, Lee et al. 1990). In α -Zellen des Pankreas entsteht hauptsächlich Glukagon. Als Nebenprodukte, deren physiologische Bedeutung unklar sind, entstehen das „Glicentin-related pancreatic peptide“ (GRPP), das „intervening peptide-1“ (IP-1) und das „major proglucagon fragment“ (MPF), in dem die Aminosäuresequenzen von GLP-1 und -2 und „intervening peptide-2“ (IP-2) enthalten sind. In den L-Zellen und im Gehirn entstehen hauptsächlich GLP-1 und GLP-2, Oxyntomodulin, das aus der Aminosäuresequenz von Glucagon und IP-1 besteht, und Glicentin, das die Sequenzen

des GRPP und des Oxyntomodulin beinhaltet. Nebenprodukt ist IP-2 (Mojsov et al. 1986) (s. Abb.2).

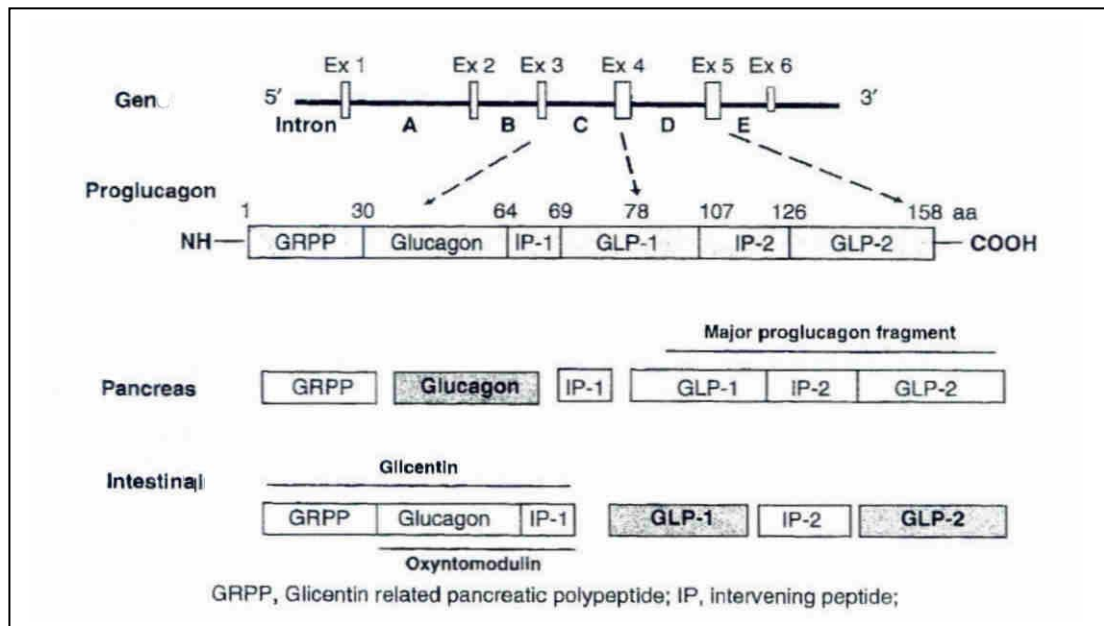


Abb.2: Genexpression von Proglucagon und dessen gewebespezifische Verarbeitung (Hui et al. 2005)

Für die posttranslationale Spaltung von Prohormonen sind sogenannte Prohormon Convertasen (PC) verantwortlich (Steiner 1998). Zwei von den fünf identifizierten Convertasen sind für die Verarbeitung des Proglucagons zuständig: PC1/3 und PC2. Verschiedene Untersuchungen an Zellkulturen, die entweder die α - oder die L-Zelle imitieren, konnten zeigen, dass PC1/3 die Spaltung von Proglucagon in L-Zellen und Nervenzellen bewirkt. Die Spaltung durch PC2 resultiert in den Produkten der α -Zellen (Rothenberg et al. 1995, 1996, Rouille et al. 1994, 1995, 1997a, 1997b, Tucker et al. 1996, Dhanvantari et al. 1996, 1998). Weiterhin litten Mäuse, die einen Defekt in der Expression von PC2 hatten, im nüchternen Zustand unter einer manifesten Hypoglykämie. Beim intraperitonealen Glukosetoleranztest war bei diesen Tieren der Anstieg des Glukosespiegels reduziert und es konnte ein Glukagonmangel festgestellt werden (Furuta et al. 1997).

An der enteroendokrinen Zelllinie GLUTag als L-Zellmodell wurde gezeigt, dass Proglucagon durch die PC 1 zu GLP-1 verarbeitet wird und dieser Prozess durch die PKA gesteuert wird und von „cAMP response elements“ (CREs) abhängt (Dhanvantari et al. 2001). Bezüglich der zellspezifischen Spaltung von Proglucagon scheinen aber auch noch andere Faktoren eine Rolle zu spielen, da in den L-Zellen des Hundes alle drei Prohormon Convertasen nachgewiesen werden konnten, wenn auch kaum Glukagon produziert wurde (Damholt et al. 1999b).

Fest steht, dass die posttranslationale Spaltung von Proglukagon eine physiologisch bedeutsame Weggabelung darstellt, da die entstehenden Hormone essentiell für die Regulation des Glukosehaushaltes sind. Während Glukagon das Lebewesen vor Hypoglykämie schützt, wirkt GLP-1 der Hyperglykämie entgegen (s.u.).

G. Regulation der GLP-1 Sekretion im Darm

Obwohl GLP-1 1968 noch nicht entdeckt war, kann man die Versuche von Unger et al. (Unger et al. 1968) als erste Untersuchungen zur Regulation der GLP-1 Sekretion verstehen. Nach intraduodener Gabe von Glukose wiesen sie eine glukagonähnliche Immunreaktivität im Blut nach, die nach i.v.-Gabe von Glukose nicht vorhanden war. Das war der erste Hinweis auf die luminale Stimulation der GLP-1 Sekretion (Herrmann et al. 1995). Mittlerweile weiss man, dass die GLP-1 Sekretion ein sehr komplexer Prozess ist, der durch Nahrungsaufnahme, Hormone und das autonome Nervensystem gesteuert wird (s.u.). Erst spezifische GLP-1 RIAs (Orskov et al. 1987a) haben das Wissen um diesen komplizierten Prozess vorangetrieben. Zum besseren Verständnis der intrazellulären Vorgänge haben Untersuchungen an primären intestinalen Zellkulturen von Ratten und Hunden beigetragen (Brubaker et al. 1987, Buchan 1987). In diesem Bereich war vor allem die Entwicklung der Tumorzelllinien GLUTag und STC-1 von grosser Bedeutung (Brubaker et al. 1992, Rindi et al. 1990).

1. nutritive Regulation

Eine Mischmahlzeit bewirkt eine biphasische Sekretion von GLP-1 bestehend aus einer frühen Antwort (15-30 min) und einer späten Antwort (30-60 min) (Herrmann et al. 1995, Elliot et al. 1993). Dabei stimuliert flüssige Nahrung die Sekretion früher und stärker als feste (Brynes et al. 1998).

Dem Inkretinkonzept entsprechend stimuliert Glukose oral verabreicht bei Mensch (Kreymann et al. 1987, Herrmann et al. 1995), Schwein (Knapper et al. 1995), Hund (Sugiyama et al. 1994) und Ratte (van-Delft et al. 1997, Kolligs et al. 1995) die GLP-1 Sekretion. Am isoliert perfundierten Rattenileum konnte gezeigt werden, dass die glukoseinduzierte GLP-1 Sekretion Na^+ -abhängig ist (Herrmann et al. 1995, Ritzel et al. 1997). Dies impliziert die Bedeutung des Na^+ -/Glukose-Kotransporters für diesen Prozess. Kohlehydrate, wie z.B. Galaktose, die ebenfalls diesen Transporter

verwenden, fördern die Freisetzung von GLP-1 im Darm. Das Gleiche gilt für Kohlehydrate, die den Fruktose-Transporter verwenden (Ritzel et al. 1997). Zwar ist es notwendig, dass die Kohlehydrate durch diese aktiven Transporter in die Zelle aufgenommen werden, aber es ist nicht essentiell, dass sie dort metabolisiert oder auf der basalen Seite der Zelle heraustransportiert werden (Ritzel et al. 1997).

Grundsätzlich wurden für die Versuche am isoliert perfundierten Rattenileum aber unphysiologisch hohe Glukosekonzentrationen verwendet (Dumoulin et al. 1998). In physiologischer Konzentration scheint Glukose nicht direkt auf die L-Zellen zu wirken (Damholt et al. 1998). Dass Glukose indirekt auf die L-Zellen wirkt, passt auch zu der Tatsache, dass einerseits der Hauptteil der Glukose vor dem Ileum absorbiert wird (Ferraris et al. 1990), und andererseits die erste Phase der GLP-1 Antwort durch Glukose ausgelöst wird (Iritani et al. 1999).

Eine Mischung aus Fetten oder Triglyceride bewirken beim Menschen oral verabreicht einen Anstieg des GLP-1 Spiegels (Herrmann et al. 1995, Elliot et al. 1993). An einem Rattenmodell lösten Triglyceride spezifisch die zweite GLP-1 Antwort aus (Iritani et al. 1999). Roberge und Brubaker verabreichten Ratten intraduodenal Fette und verhinderten deren Passage ins Ileum. Somit hatten die Fette keinen direkten Kontakt mit L-Zellen. Die Sekretion von GLP-1 wurde aber trotzdem stimuliert (Roberge et al. 1991). Fettsäuren stimulieren aber auch direkt die L-Zellen (Rocca et al. 1995, Barber et al. 1991), wobei scheinbar ungesättigte langkettige Fettsäuren im Vergleich zu kurzkettigen oder gesättigten Fettsäuren eine grössere Wirkung zeigen (Cuche et al. 2000, Thomsen et al. 1999). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass für die GLP-1 Freisetzung durch Fette eine proximal-distale Schleife im Darm vorhanden ist, an der das enterische Nervensystem und der afferente und efferente Vagus beteiligt sind (Rocca et al. 1999). Einfach ungesättigte Fettsäuren scheinen bei Ratten die Sensibilität der L-Zellen für GIP zu verbessern und so die GLP-1 Sekretion zu steigern (Rocca et al. 2001).

In in vivo Versuchen am Menschen (Herrmann et al. 1995, Elliot et al. 1993) und an der Ratte (Cordier-Bussat et al. 1998) waren Proteine oder Aminosäuren nicht eindeutig in der Lage, eine GLP-1 Sekretion auszulösen. Aber Proteinhydrolysate, Peptone, bewirkten am isoliert perfundierten Rattenileum und an STC-1 Zellen eine GLP-1 Ausschüttung (Cordier-Bussat et al. 1998).

2. endokrine Regulation

Bei Kindern wirkt Insulin inhibierend auf die GLP-1 Sekretion (Matsuyama et al. 1975), möglicherweise als negatives Feedback. Weiterhin konnte an intestinalen L-Zellen von Ratten und Hunden gezeigt werden, dass Somatostatin-28 die GLP-1 Ausschüttung hemmt (Damholt et al. 1998, Barber et al. 1991). In vivo konnte das an Ratten bestätigt werden (Bloom et al. 1982). Am isoliert perfundierten Schweineileum wurde gezeigt, dass das so wirkende Somatostatin-28 aus epithelialen parakrinen Zellen stammt (Hansen et al. 2000).

GIP wirkt stimulierend auf die GLP-1 Sekretion in L-Zellkulturen (Damholt et al. 1998, Brubaker 1991, Brubaker et al. 1998) und in vivo bei Ratten, denen GIP in postprandialer Konzentration infundiert wurde (Roberge et al. 1993). Letzteres liess sich aber beim Menschen nicht bestätigen (Nauck et al. 1993b, Schirra et al. 1997). GIP scheint beim Menschen kein direkter Bestandteil einer proximal-distalen Schleife des Darms zu sein. Es wird auch eine parakrine Wirkung des GIP auf die L-Zellen im Jejunum vermutet, da bei Hunden dort die K-Zellen, in denen das GIP produziert wird, direkt bei den L-Zellen liegen (Damholt et al. 1999a).

3. neurale Regulation

An Ratten konnte gezeigt werden, dass der Vagus essentiell für die Fett-induzierte Ausschüttung von GLP-1 ist (Rocca et al. 1999). Das Neuropeptid Gastrin-releasing peptide ist einer der Hauptbotenstoffe im nonadrenergen/noncholinergen Teil des Nervus vagus (Greenberg 1987). Es stimuliert in vitro an intestinalen Zellen von Ratten und Hunden (Damholt et al. 1998, Brubaker 1991, Saifia et al. 1998) und in vivo beim Menschen (Bruzzzone et al. 1983) die GLP-1 Sekretion.

Das Neuropeptid Galanin inhibiert sowohl die basale als auch die durch Gastrin-releasing peptide stimulierte GLP-1 Sekretion im Rattenileum (Saifia et al. 1998, Herrmann-Rinke et al. 1996). Acetylcholin und muskarine Agonisten stimulieren am isoliert perfundierten Rattenileum die GLP-1 Sekretion, während Atropin diese Stimulation hemmt (Brubaker 1991, Herrmann-Rinke et al. 1996, Dumoulin et al. 1995). An GLUTag Zellen konnte das auf zellulärer Ebene bestätigt werden (Brubaker et al. 1998). Am Menschen konnte gezeigt werden, dass GLP-1 glukoseabhängig in

Impulsen ausgeschüttet wird und die Impulsamplitude durch cholinerg-muskarine Agonisten gesteigert und durch Atropin vermindert wird (Balks et al. 1997).

Auch Adrenalin und Isoproterenol stimulieren am isoliert perfundierten Rattenileum die GLP-1 Sekretion und zwar über den β 2-Rezeptor (Dumoulin et al. 1995, Claustre et al. 1999). Während Adrenalin und Isoproterenol auf intestinale Zellen der Ratte und GLUTag Zellen direkt keine Wirkung haben (Brubaker 1991, Brubaker et al. 1998), stimulieren sie aber bei intestinalen Zellen vom Hund die GLP-1 Sekretion (Buchan et al. 1987).

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Komplexität der durch Nahrungsaufnahme ausgelösten Sekretion von GLP-1 aus den L-Zellen des Darms.

H. Metabolismus des GLP-1

Für die biologische Aktivität des GLP-1 spielen sein Metabolismus und seine Elimination eine entscheidende Rolle.

Eine renale Ausscheidung von sowohl endogenem als auch exogenem GLP-1 konnte bei anästhesierten Schweinen nachgewiesen werden (Deacon et al. 1996). Ratten wurde radioaktiv markiertes GLP-1 verabreicht. Nach 10 min konnte der Metabolit GLP-1(9-36)amid vor allem in den Nieren nachgewiesen werden (Hassan et al. 1999). Nephrektomie oder Ligation der Ureteren steigerte bei Ratten die Halbwertszeit des GLP-1 im Blut (Ruiz-Grande et al. 1993). Die Immunreaktivität des GLP-1 ist bei Menschen mit Urämie signifikant erhöht (Orskov et al. 1992b). All dies spricht für die Niere als wichtigen Eliminationsweg für GLP-1.

Auch wenn eine hepatische Ausscheidung von endogenem GLP-1 bei Schweinen nicht nachweisbar war, konnte doch eine Elimination von infundiertem GLP-1 durch die Leber gemessen werden. Dabei spielt die Deaktivierung des GLP-1 durch Dipeptidyl-Peptidase IV scheinbar eine grosse Rolle, da dieses Enzym in hoher Konzentration in Hepatozyten nachweisbar ist (Deacon et al. 1996).

Beim Schwein (Deacon et al. 1996), bei der Ratte (Ruiz-Grande et al. 1993) und beim Menschen (Kreymann et al. 1987) liegt die mittlere Clearance-Rate für GLP-1 bei ca. $10\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und die mittlere Halbwertszeit im Plasma bei ca. 5 min. Da bei der Messung von immunoreaktivem GLP-1 teilweise auch degradierte Produkte, die nicht biologisch aktiv sind, mitgemessen werden, entspricht die mittlere Halbwertszeit des

GLP-1 nicht der Halbwertszeit der biologischen Aktivität. Diese beträgt nur etwa 1-2 min (Kieffer et al. 1995), da GLP-1 z.B. im Schwein direkt nach der Sekretion aus der L-Zelle zu 50% durch die Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP IV) im Endothel der abführenden Kapillaren in den Metaboliten GLP-1(9-36)amid abgebaut wird (Hansen et al. 1999). Dieser Metabolit wirkt sogar als Antagonist am Pankreas (Knudsen et al. 1996). Neben GLP-1(9-36)amid, das den grössten Anteil der Metaboliten ausmacht, konnten am Hundemodell auch noch GLP-1(7-35) und GLP-1(7-34) nachgewiesen werden (Knudsen et al. 1996). Das bestätigt die Versuche, bei denen GLP-1 mit humanen neutralen Endopeptidasen und RINm5F Plasmamembranen inkubiert wurde. Die RINm5F Zelllinie ist eine β -Zelllinie, auf der Ektopeptidasen nachgewiesen wurden. Es konnten multiple Metaboliten nachgewiesen werden (Hupe-Sodmann et al. 1995, 1997). Es scheint also auch im Blut und an den β -Zellen des Pankreas ein proteolytischer Abbau und somit eine Deaktivierung des GLP-1 stattzufinden.

I. Physiologische Wirkungen des GLP-1

Die physiologische Wirkung von GLP-1 zeigt sich an Organen, die den spezifischen GLP-1 Rezeptor exprimieren: Inselzellen des Pankreas, Magen, Lunge, Gehirn, Nieren, Hypophyse, Herz und Dünndarm (Bullock et al. 1996, Campos et al. 1994). Obwohl in Leber, Fettgewebe und Skelettmuskel kein spezifischer GLP-1 Rezeptor nachweisbar ist (Bullock et al. 1996), scheint GLP-1 auch dort eine Wirkung zu haben, die vermutlich über einen noch zu identifizierenden Rezeptor vermittelt wird (s.u.). Allerdings sind diese Befunde umstritten.

1. Inselzellen des Pankreas

Die erste biologische Wirkung, die für GLP-1 nachgewiesen wurde, war die Stimulation der glukoseabhängigen Insulinsekretion der β -Zellen im Pankreas, ein Mechanismus, der den Organismus vor Hypoglykämien bewahrt (Mojsov et al. 1987, Holst et al. 1987, Kreymann et al. 1987). Dies wurde in verschiedenen Studien in vitro bestätigt (Göke, R et al. 1993a und b, 1989b, Weir et al. 1989). Mit Hilfe des GLP-1 Antagonisten Exendin(9-39) konnte der Inkretineffekt auch in vivo an Ratten (Kolligs et al. 1995) und Menschen (Schirra et al. 1998a) nachgewiesen werden. Weiterhin haben heterozygote GLP-1 Rezeptor (+/-)-Mäuse einen pathologischen

Glukosetoleranztest mit erniedrigter glukosestimulierter Insulinsekretion (Scrocchi et al. 1998)

Im Gegensatz zu Sulfonylharnstoffen stimuliert GLP-1 auch die Genexpression und Biosynthese von Proinsulin (Gerich 1989, Fehmann et al. 1992a). Während GIP seine Inkretinwirkung bei Individuen mit Diabetes mellitus Typ 2 verliert, behält GLP-1 diese Fähigkeit (Nauck et al. 1993a, Elahi et al. 1994) und verbessert ebenfalls bei Patienten mit gestörter Glukosetoleranz die Sensibilität und Reaktionsfähigkeit der β -Zellen auf Glukose (Byrne et al. 1998).

An INS-1 Zellen wurde gezeigt, dass GLP-1 zusammen mit Glukose die Expression von „immediate early response“ Genen aktiviert. Diese kodieren für Transkriptionsfaktoren wie c-fos, c-jun und junB, die für die Proliferation und Differenzierung der Zelle notwendig sind (Susini et al. 1998). Weiterhin wurde an RIN1046-38 Zellen (Wang,-X et al. 1999), Ratten (Perfetti et al. 2000) und Mäusen (Stoffers et al. 2000) gezeigt, dass GLP-1 die Expression des Transkriptionsfaktors IDX-1 fördert. Dieser ist nicht nur an der Proliferation und Neogenese der β -Zellen beteiligt, sondern fördert auch die Transkription des Insulingens (Wang,-X et al. 1999, Hussain et al. 2000). So bewirkt GLP-1 bei Anwesenheit von IDX-1 in duktalem Pankreaszellen eine Differenzierung zu insulinausschüttenden Zellen (Hui et al. 2001). Diese Ergebnisse passen auch zu den Untersuchungen von Xu et al., bei denen bei teilpankreatektomierten Ratten der GLP-1 Agonist Exendin-4 die Proliferation und Neogenese der β -Zellen und eine verbesserte Glukosetoleranz bewirkt (Xu et al. 1999). Auch auf α - und δ -Zellen der Inselzellen konnten GLP-1 Rezeptoren nachgewiesen werden (Heller,-R-S et al. 1995, 1997, Fehmann et al. 1991b). GLP-1 fördert die Sekretion von Somatostatin an isolierten Ratteninseln (Heller,-R-S et al. 1995) und am isoliert perfundierten Pankreas der Ratte und des Hundes (Kawai et al. 1989). Obwohl GLP-1 in vivo an gesunden Probanden die Glukagon Sekretion hemmt (Kreymann et al. 1987, Elahi et al. 1994), stimuliert es in vitro die Ausschüttung von Glukagon aus den α -Zellen (Heller,-R-S et al. 1997, Ding et al. 1997). Heller et al. nehmen an, dass kleine Mengen biologisch aktiven GLP-1 im Nüchternzustand auf autokrin/parakrinem Weg über GLP-1 Rezeptoren an α -Zellen die Biosynthese von Glukagon fördern (Heller,-R-S et al. 1997). Nach Nahrungsaufnahme wird dieser Effekt unterdrückt, da die Spiegel für Insulin, Somatostatin und Glukose ansteigen und diese kollektiv die Sekretion von Glukagon hemmen. Die Hemmung der Glukagonsekretion von GLP-1 in vivo ist wahrscheinlich indirekt auf eine intransulär-parakrin vermittelte Wirkung

von Insulin und Somatostatin zurückzuführen. Grundsätzlich scheint aber das Glukagon-stimulierende GLP-1 Signal nicht zwingend für die Aufrechterhaltung eines stabilen Glukagonspiegels nötig zu sein, da bei GLP-1 Rezeptor (-/-) Mäusen der mRNA Spiegel des Proglukagons im Pankreas normal war; genauso wie der Nüchtern- und Postprandialspiegel von Glukagon im Blut (Scrocchi et al. 1998).

2. Magen

Funktionen des Magens können durch den distalen Teil des Dünndarmes gesteuert werden. Bereits 1977 zeigten Clain et al. am Menschen, dass Chymus bei Umgehung des Ileums eine geringere Magensekretion zur Folge hat, als wenn Chymus den gesamten Dünndarm durchwandert (Clain et al. 1977). Die Anwesenheit von Chymus oder teilweise verdauten Fetten im Ileum des Menschen bewirkt eine Hemmung der Magenentleerung und Motilität des Jejunum, die so genannte „ileal brake“ (ileale Bremse) (Spiller et al. 1984, Lin,-H-C et al. 1997). Wie bereits oben erwähnt ist Fett ein potenter Stimulator von GLP-1, was vermuten liess, dass GLP-1 möglicherweise zur Regulation der Magenfunktion beiträgt. Es konnte beim Menschen auch mehrfach gezeigt werden, dass GLP-1 sowohl die durch Pentagastrin oder Nahrungsaufnahme ausgelöste Magensäuresekretion als auch die Magenentleerung hemmt. Dies setzt voraus, dass GLP-1 in einer Menge infundiert wird, die einem physiologischen postprandialen Plasmaspiegel entspricht (Schirra et al. 1997, Schjoldager et al. 1989, Wishart et al. 1998, Nauck et al. 1997b, Wettergren et al. 1997a). Nach Versuchen an Ratten und Schweinen (Imeryuz et al. 1997, Wettergren et al. 1998b, 1998c) konnte auch beim Menschen gezeigt werden, dass diese Wirkung von GLP-1 über zentrale Vaguskerne geregelt wird (Wettergren et al. 1997b, Schirra et al. 2000).

3. Lunge

Auf Membranen der Rattenlunge (Campos et al. 1994, Kanse et al. 1988, Richter et al. 1990) und auf glatten Gefässmuskelzellen (Richter et al. 1993) wird der GLP-1 Rezeptor in grosser Dichte expremiert. Die Behandlung von Trachea und Arteria pulmonalis der Ratte mit GLP-1 bewirkt eine Hemmung der Schleimsekretion und Entspannung der glatten Muskelzellen (Richter et al. 1993). Der GLP-1 Rezeptor in

der Lunge ist bis auf ein Kodon identisch mit dem Rezeptor auf den β -Zellen der Pankreasinseln und hat, wenn in CHO-Zellkultur (chinese hamster ovary) exprimiert, ein dem Rezeptor im Pankreas sehr ähnliches pharmakologisches Profil (Lankat-Buttgereit et al. 1994). Weiterhin ist mRNA des GLP-1 Rezeptors in humanen Pneumozyten Typ 2 nachweisbar (Bullock et al. 1996). GLP-1 stimuliert an diesen die Sekretion von Surfactant (Benito et al. 1998, Vara et al. 2001). Insgesamt ist die physiologische Rolle des GLP-1 in der Lunge aber noch unklar. Dass der GLP-1 Rezeptor in der Lunge so stark vertreten ist, deutet auf eine wichtige physiologische Funktion hin. Es ist schwierig sich vorzustellen, welcher Zusammenhang zwischen der nahrungsabhängigen Ausschüttung von GLP-1 aus dem Darm und der Wirkung in der Lunge bestehen könnte. Eine Möglichkeit wäre eine lokale Produktion von Proglukagon und GLP-1 in der Lunge und somit eine parakrine Wirkung. Es konnte aber bisher keine Expression von Proglukagon in der Lunge nachgewiesen werden.

4. Gehirn

GLP-1 konnte im Gehirn von Ratten, Affen und Menschen in Zellen der Medulla oblongata (Shimizu et al. 1987, Jin,-S-L et al. 1988, Drucker et al. 1988, Larsen et al. 1997a, Kauth et al. 1987) und besonders in Zellen im dorsalen und ventralen Teil der Formatio reticularis und im Nucleus solitarius (Jin,-S-L et al. 1988, Larsen et al. 1997a, Rinaman 1999a) nachgewiesen werden. Ebenso konnte mit Hilfe von in situ Hybridisierung im Rattenhirn mRNA vom GLP-1 Rezeptor im Hypothalamus in grosser Dichte im Nucleus supraopticus, paraventricularis und arcuatus nachgewiesen werden (Bullock et al. 1996, Navarro et al. 1996, Shughrue et al. 1996). Durch RT-PCR Klonierung konnte zum einen die Expression von GLP-1 Rezeptor im menschlichen Gehirn und zum anderen die Gleichheit der Aminosäuresequenzen dieses Rezeptors mit dem GLP-1 Rezeptor in der β -Zelle bestätigt werden (Wei et al. 1995).

Mehrere Studien konnten zeigen, dass GLP-1 intrazerebroventrikulär bei Ratten appliziert signifikant die Nahrungs- und Wasseraufnahme hemmt (Davis et al. 1998, Wang,-T et al. 1998, Tang-Christensen et al. 1996, McMahon et al. 1998, Edwards et al. 2000). Die Applikation des GLP-1 Agonisten Exendin-4 hatte eine identische, sogar verstärkte Wirkung (Al-Barazanji et al. 2000, Szayna et al. 2000, Rodriguez-de-Fonseca et al. 2000). Diese konnte mit einem selektiven GLP-1 Antagonisten

aufgehoben werden (Meeran et al. 1999, Rinaman 1999b, Seeley et al. 2000, Thiele et al. 1998).

Um den Wirkort von GLP-1 im Gehirn genauer bestimmen zu können, wurde die Expression vom „immediate early responsive“ Transkriptionsfaktor c-fos als Marker für Hirnaktivität gemessen. In verschiedenen Studien mit Ratten bewirkte die intrazerebroventrikuläre Gabe von GLP-1 eine Expression von c-fos im Nucleus arcuatus, in der Area postrema, dem caudalen Anteil des Nucleus solitarius, im Nucleus paraventricularis und Nucleus supraopticus des Hypothalamus und zentral im Corpus amygdaloideum (Turton et al. 1996, Van-Dijk,-G et al. 1996, Rowland et al. 1997, Larsen et al. 1997b). Die intrazerebroventrikuläre Gabe von GLP-1 unterdrückt die appetitstimulierende Wirkung von Melanin-concentrating hormone (MCH) und Neuropeptid Y (NPY) bei Ratten (Tritos et al. 1998). Dieser Effekt war nicht mehr nachweisbar, nachdem bei jungen Ratten durch Mononatriumglutamat der Nucleus arcuatus und Teile des zirkumventrikulären Organes zerstört worden waren (Tang-Christensen et al. 1998).

Zur Zeit ist nicht klar, ob das Hungergefühl durch im Gehirn sezerniertes GLP-1 oder durch peripher produziertes GLP-1 beeinflusst wird. Möglicherweise sind auch beide Mechanismen beteiligt.

Bei Ratten hat die intraperitoneale Gabe von GLP-1 im Gegensatz zur intrazerebroventrikulären Gabe keine Wirkung auf die Nahrungsaufnahme (Turton et al. 1996, O'Shea et al. 1996). Dagegen konnte beim Menschen nach i.v.-Gabe von GLP-1 parallel zu einer Testmahlzeit eine reduzierte Nahrungsaufnahme und abgeschwächtes Hungergefühl festgestellt werden (Flint et al. 1998, 2000, Gutzwiller et al. 1999, Naslund et al. 1999). Dies bestätigt die Wirkung des peripheren GLP-1. Die zirkumventrikulären Organe des Gehirns befinden sich ausserhalb der Blut-Hirn-Schranke und stellen vermutlich den Ort dar, über den GLP-1 auf das ZNS einwirken kann (Orskov et al. 1996).

In neueren Studien wurde auch ein Zusammenhang zwischen dem anorektisch wirkenden Hormon Leptin und GLP-1 nachgewiesen. Es scheint, dass Leptin die Produktion und Sekretion von GLP-1 im Nucleus solitarius fördert (Elias et al. 2000, Goldstone et al. 2000). Diese Sekretion hat eine anorektische Wirkung zur Folge (Van-Dijk et al. 1996), die durch den GLP-1 Antagonisten Exendin (9-39) gehemmt werden kann (Goldstone et al. 1997). Diese Untersuchungen sprechen für die direkt intrazerebrale Wirkung von GLP-1.

Ausser der Regulation des Hungergefühls scheint GLP-1 intrazerebral auch an der allgemeinen Stressantwort des Körpers beteiligt zu sein (Rinaman 1999a). Intraperitoneal gespritzte Lipopolysaccharide (LPS) verursachen bei Ratten Fieber. Wenn man intrazerebral einen GLP-1-Antagonisten spritzt, steigt das Fieber stärker an. Der GLP-1 Antagonist allein verursacht kein Fieber. Man kann schlussfolgern, dass GLP-1 zentral den Fieberreiz von LPS reduziert (Rinaman et al. 2000).

Nach penetrierendem Trauma am Rattenhirn konnte eine verstärkte Expression von GLP-1 Rezeptoren in den Gliazellen festgestellt werden (Chowen et al. 1999).

5. Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Im Zusammenhang der körperlichen Stressantwort spielt GLP-1 auch eine Rolle in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. Es kann im Hypothalamus nachgewiesen werden und wirkt kurzfristig inhibierend auf die stressinduzierte ACTH-Ausschüttung in der Hypophyse. Es unterdrückt die stressinduzierte Corticosteron Antwort von ACTH auf die Zellen der Zona fasciculata reticularis durch das Inhibieren einer PKA-Kaskade, während der basale Corticosteron Spiegel nicht beeinflusst wird. Dies geschieht über spezifische GLP-1 Rezeptoren (Nussdorfer et al. 2000, Andreis et al. 1999, Göke,-R et al. 1995). GLP-1 Rezeptor-negative Mäuse hatten zwar einen normalen basalen Corticosteron Spiegel, aber unter Stress stiegen die Werte von Corticosteron übermässig an (MacLusky et al. 2000).

6. Schilddrüse

An α -TSH Zellen, einer thyreotropen Rattenzelllinie, wurde der GLP-1 Rezeptor nachgewiesen. GLP-1 bewirkt in diesen Zellen einen Anstieg von cAMP, der durch Exendin(9-39) gehemmt wird. An isolierten Zellen des Hypophysenvorderlappens der Ratte bewirkt GLP-1 dosisabhängig die Sekretion von TSH (Beak et al. 1996).

In CA-77 Zellen, einer C Zelllinie aus einem medullären Schilddrüsenkarzinom der Ratte, stimuliert GLP-1 über seinen eigenen Rezeptor die Calcitonin Sekretion. Exendin(9-39) hemmt diesen Effekt. An einem Perfusionsmodell mit Ratten bewirkte

das Hormon die kalziumabhängige Calcitoninsekretion aus der normalen Schilddrüse (Crespel et al. 1996, Lamari et al. 1996).

7. Kardiovaskuläres System

Bei Wistar Ratten wurde GLP-1 entweder systemisch oder intrazerebroventrikulär appliziert und der arterielle Blutdruck sowie der Vasopressin- und Oxytocinspiegel im Blut wurden gemessen. Beide Applikationsformen steigerten den Blutdruck. Systemisch gegeben stiegen die Vasopressin- und Oxytocinspiegel an. Zentral gegeben fielen sie bei kleinen Dosen und stiegen bei hohen Dosen an (Bojanowska et al. 2000). Barragan et al. zeigten an einem Rattenmodell, dass GLP-1 und Exendin-4 nach i.v.-Gabe den diastolischen und systolischen Blutdruck und die Herzfrequenz dosisabhängig steigern. Exendin-4 wirkt länger als GLP-1. Exendin(9-39) antagonisiert diese Wirkung. Die alleinige Gabe von Exendin(9-39) hat keine Wirkung. Die Regulation der Kreislaufparameter durch GLP-1 scheint durch den GLP-1 Rezeptor vermittelt zu werden (Barragan et al. 1996). Weiterhin wurde bei Ratten im Nucleus paraventricularis die Kollokalisierung von mRNA des GLP-1 Rezeptors und des Vasopressins und Oxytocins festgestellt (Zueco et al. 1999). GLP-1 stimuliert im Hypothalamus die Arginin-Vasopressin-Ausschüttung (Nussdorfer et al. 2000).

Um zu untersuchen, ob GLP-1 die Kreislaufparameter nur über einen zentralen Mechanismus beeinflusst, wurden an einem Rattenmodell unterschiedliche Kombinationen zentraler und peripherer Gaben von GLP-1 und seinem Antagonisten Exendin-(9-39) und bilateraler Vagotomie verwendet. So konnte gezeigt werden, dass GLP-1 die Kreislaufparameter stimuliert, indem eine zentrale und eine periphere Steuerung zusammenwirken, die über den Vagus miteinander in Kontakt stehen (Barragan et al. 1999). Diese Ergebnisse passen auch zum Nachweis von GLP-1 Rezeptoren im Herzen (Bullock et al. 1996).

Bei gesunden Probanden konnte ein Blutdruckanstieg parallel zur Konzentration von i.v.-verabreichtem GLP-1 beobachtet werden (Edwards et al. 1998).

8. Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe

Obwohl in Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe der GLP-1 Rezeptor nicht nachweisbar war (Bullock et al. 1996), soll GLP-1 in vitro an Zelllinien dieser Gewebe

eine anabole Wirkung haben. An Hepatozyten und Myozyten stimuliert es die Glykogensynthese (Lopez-Delgado et al. 1998, Galera et al. 1996, Yang et al. 1998) und in Myozyten und Adipozyten fördert es die Aufnahme von Glukose in die Zelle (Hansen,-B-F et al. 1998, O'Harte et al. 1997, Wang,-Y et al. 1997, Miki et al. 1996). An diesen Zellen scheint GLP-1 seine Wirkung über Inositolphosphoglykane weiterzugeben. Diese sind Second-Messenger beim Insulin. Der dazugehörige Rezeptor scheint sich biochemisch und funktionell von dem an den β -Zellen des Pankreas zu unterscheiden (Galera et al. 1996, Marquez et al. 1998, Trapote et al. 1996, Montrose-Rafizadeh et al. 1997). Ein lipogener Effekt konnte in vitro bei Adipozyten nicht nachgewiesen werden (Dawson et al. 1999).

In vivo konnte (mit Ausnahme einer Studie an gesunden Probanden (Shalev et al. 1998)) an Mäusen (Ahren et al. 1999), pankreatektomierten Hunden (Freyse et al. 1997, 1999, Sandhu et al. 1999), gesunden Probanden (Toft-Nielson et al. 1996, Ryan et al. 1998, Orskov et al. 1996, Larsson et al. 1997), Typ I Diabetikern (Creutzfeldt et al. 1996) sowie Typ II Diabetikern (Vella et al. 2000) diese direkte anabole Wirkung des GLP-1 nicht bestätigt werden. Es wirkt nur indirekt über die Hemmung der Glukagonsekretion, Steigerung der Insulinsekretion und zu einem geringen Teil auch durch die Steigerung der Insulinsensitivität von Hepatozyten und wahrscheinlich auch Adipozyten (Freyse et al. 1997, 1999, Sandhu et al. 1999, Toft-Nielson et al. 1996, Ryan et al. 1998, Orskov et al. 1996, Creutzfeldt et al. 1996).

An Ratten konnte ausserdem gezeigt werden, dass die Wirkung von GLP-1 auf die β -Zellen im Pankreas nicht nur direkt vermittelt wird, sondern GLP-1 auch hepatische Afferenzen des Vagus erregt, die ein Signal über vagale Efferenzen zum Pankreas schicken (Ohnuma et al. 1996, Nishizawa et al. 1996, 2000, Nakabayashi et al. 1996).

J. GLP-1 Rezeptor

1. Struktur

Ein spezifischer Rezeptor für GLP-1 wurde erstmals 1988 von Göke und Conlon auf der Ratteninsulinomzelllinie RINm5F nachgewiesen (Göke-R und Conlon-J-M 1988a). Danach folgte der Nachweis auf verschiedenen Insulinomzelllinien (Orskov et al. 1988, Fehmann et al. 1991a), Insulinomzellmembranen der Ratte (Göke,-R et al. 1989a) und des Menschen (Lankat-Buttgereit et al. 1994) sowie Somatostatin-

produzierenden Zellen (Fehmann et al. 1991b). Der Rezeptor wurde als ein ca. 63 kDa grosses Protein identifiziert (Göke,-R et al. 1989a, 1992). So konnte der GLP-1 Rezeptor der Ratte (Thorens 1992) und dann der der β -Zelle des Menschen (Dillon et al. 1993, Thorens et al. 1993, van Eyll et al. 1994) kloniert werden. Dabei zeigte sich, dass der humane GLP-1 Rezeptor aus einer Sequenz von 463 Aminosäuren mit sieben hydrophoben Anteilen besteht, die die transmembranen Domänen repräsentieren. Die Homologie der Aminosäuresequenz des humanen Rezeptors zum Rezeptor der Ratte beträgt 90%. Das Gen für den humanen GLP-1 Rezeptor ist auf Chromosom 6p21 lokalisiert (Stoffel et al. 1993). Im Gen des humanen GLP-1 Rezeptors wird die kodierende Sequenz von zwölf unregelmässig langen Introns unterbrochen. Im Vergleich zu anderen verwandten Rezeptoren ist in der Rezeptorklasse, zu der der GLP-1 Rezeptor gehört, die Exon/Intron Organisation stark konserviert (Wilmen et al. 1998). Mit seinen sieben transmembranären Domänen gehört er zur grossen Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und in dieser zur Klasse B.

GPCR sind Proteine, die mit Hilfe von trimerischen GTP-bindenden Regulatorproteinen (G-Proteine) Signale von der Zelloberfläche an das Zellinnere weitergeben. Die Aktivierung des G-Proteins bewirkt eine intrazelluläre Veränderung von Enzymkonzentrationen oder der Ionenpermeabilität der Zellmembran, die wiederum Signalkaskaden mit Hilfe anderer Proteine in der Zelle auslöst (Alberts et al. 1994). Für den GLP-1 Rezeptor konnten Gs-, Gi- und Gq-Proteine nachgewiesen werden (Montrose-Rafizadeh et al. 1999). Gs aktiviert die Adenylatzyklase und Ca^{2+} -Kanäle, Gi hemmt die Adenylatzyklase und aktiviert K^+ -Kanäle und Gq aktiviert die Phospholipase C- β (Alberts et al. 1994).

Der GLP-1 Rezeptor gehört in der grossen Familie der GPCR zur Klasse B (Sekretin-ähnliche Rezeptoren). Ihre Sequenzen haben keine Ähnlichkeit mit denen der anderen GPCR-Klassen und zeichnen sich aus durch:

1. eine lange N-terminale extrazelluläre Domäne von 120-180 Aminosäuren, die sechs stark konservierte Cysteine enthält
2. das Fehlen der Aminosäuresequenz Asp-Arg-Tyr oder Glu-Arg-Trp im N-terminalen Teil der 2. intrazellulären Schleife (stark konserviert in Klasse A der GPCR)
3. eine spezifische Verteilung von Prolinen in den transmembranären Domänen
4. spezifisch konservierte Aminosäuren in den transmembranären Domänen (Segre et al. 1993, Vilardaga et al. 2001)

Weitere Rezeptoren dieser Klasse sind Rezeptoren für Sekretin (Ishihara et al. 1991), Parathormon (Jüppner et al. 1991), Calcitonin (Lin,-H-Y et al. 1991), vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) (Ishihara et al. 1992), pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) (Spengler et al. 1993), growth hormone-releasing factor (GRF) (Mayo), gastric inhibitory peptide (GIP) (Usdin et al. 1993), Glukagon (Jelinek et al. 1993) und andere (Horn et al. 2001).

2. Verteilung

Der GLP-1 Rezeptor wird in Inselzellen des Pankreas, Magen, Lunge, Gehirn, Nieren, Hypophyse, Herz und Dünndarm exprimiert (Bullock et al. 1996, Campos et al. 1994, Shughrue et al. 1996, Beak et al. 1996, Crespel et al. 1996, Lamari et al. 1996). Dabei wurde festgestellt, dass der GLP-1 Rezeptor in der Lunge ein molekulares Gewicht von 55 kDa aufweist (Richter et al. 1990, 1991). Dagegen wiegt der GLP-1 Rezeptor der β -Zelle 63 kDa, obwohl die Aminosäuresequenz fast identischen ist (Lankat-Buttgereit 1994). Möglicherweise liegt dieser Unterschied an der posttranslationalen Modifikation, wie z.B. Glykosilierung. Es konnte gezeigt werden, dass für den GLP-1 Rezeptor der β -Zelle die Glykosilierung für eine normale Rezeptorfunktion notwendig ist (Göke,-R et al. 1994).

Obwohl in Leber, Fettgewebe und Skelettmuskel kein spezifischer GLP-1 Rezeptor nachweisbar ist (Bullock et al. 1996), wird die Wirkung an diesen Geweben diskutiert (s.o.). In 3T3-L1 Adipozyten wurde mit Hilfe von Primern, die dem N- und C-Terminus des GLP-1 Rezeptors ähnlich sind, ein neues Protein mit sieben transmembranären Domänen nachgewiesen, das 298 Aminosäuren lang ist und wenig Homologie zum GLP-1 Rezeptor oder anderen G-Protein-bindenden Rezeptoren aufweist. Es wurde TPRA40 genannt (transmembrane domain protein of 40 kDa regulated in adipocytes). Es wird mehr in epididymalem Fett von alten (24 Monate) als in jungen Mäusen und mehr in diabetischen als nicht diabetischen Mäusen produziert. Es scheint also ein membranäres Protein zu sein, was vermehrt in weissem Fett von alten und diabetischen Mäusen produziert wird (Yang,-H et al. 1999). Ob es mit GLP-1 interagiert, ist noch unklar.

3. Signaltransduktion

Die insulinotrope Wirkung von GLP-1 an der β -Zelle des Pankreas wird am GLP-1 Rezeptor unter anderem über ein Gs-Protein vermittelt, das die Adenylatzyklase aktiviert. Diese wandelt ATP in cAMP um, was wiederum die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Diese wandert in den Zellkern und phosphoryliert den Transkriptionsfaktor CREB, der an das CRE im Promotor des Proinsulins gebunden ist, und aktiviert so die Transkription des Proinsulins und setzt so die Biosynthese von Insulin in Gang (Habener 1996, Skoglund et al. 2000). Ausserdem potenziert das cAMP die Glukose-induzierte Schliessung von ATP-sensitiven K^+ (K-ATP)-Kanälen (Holz et al. 1993), was zur Depolarisation der Zelle und dadurch zur Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen vom L-Typ und dem Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle führt (Kato et al.). Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle ist ein wichtiger Trigger für die Exozytose von Insulin (Gromada et al. 1997, 1998a). Aber auch nichtselektive Kationen Kanäle, die sowohl für Na^+ als auch für Ca^{2+} permeabel sind, spielen eine Rolle bei der Deaktivierung von K-ATP-Kanälen (Kato et al. 1996, Leech et al. 1997, 1998). Dies bestätigte auch eine Studie von Suga et al., die eine cAMP-unabhängige Abnahme der K-ATP-Kanal Aktivität nachwies (Suga et al. 2000).

Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beruht nicht nur auf dem Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} , sondern auch von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Durch cAMP wird ein Ryanodin-sensitiver Ca^{2+} -Kanal am endoplasmatischen Retikulum aktiviert (Holz et al. 1999).

GLP-1 bewirkt durch einen weiteren Mechanismus die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (Gromada et al. 1998b, Bode et al. 1999). Dafür vermittelt GLP-1 sein Signal durch den GLP-1 Rezeptor über ein Gq-Protein. Dieses aktiviert die Phospholipase C- β , die Phosphatidylinositol-Bisphosphat (PIP_2) in Inositol-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol spaltet. IP_3 aktiviert dann Ca^{2+} -Kanäle am endoplasmatischen Retikulum. Diacylglycerol aktiviert dagegen die Proteinkinase C (PKC), die wichtig für die Regulation der GLP-1 Rezeptorexpression ist (s.u.).

Die Aktivierung von PDX-1, das einerseits die Proliferation und Neogenese der β -Zelle fördert, und andererseits eine Rolle bei der Transkription des Proinsulins spielt, wird ebenfalls durch die Gs-cAMP-PKA-Kaskade ausgelöst (Wang,-X et al. 1999, 2001, Hussain et al. 2000).

4. Regulation der Rezeptorexpression und -sensitivität

An RIN5mF Zellen bewirkt GLP-1 eine Desensibilisierung des GLP-1 Rezeptors durch Herabsetzung der Bindungskapazität. Dabei wurde eine Abnahme der GLP-1 Rezeptor mRNA-Menge in der Zelle festgestellt. Diese Abnahme wird nicht über die Proteinkinase A (PKA) vermittelt. Allerdings bewirken PKA Agonisten innerhalb von drei Stunden trotz gleichbleibender GLP-1 Rezeptor mRNA-Menge eine Reduktion der GLP-1 Rezeptorexpression. Daher scheint die GLP-1 Rezeptorexpression nicht nur auf der Transkriptionsebene, dort unabhängig von PKA, sondern auch auf der Posttranslationsebene, hier abhängig von der PKA, reguliert zu werden (Fehmann et al. 1996a). Auf der Ebene der Transkription scheint die Proteinkinase C (PKC) einen hemmenden Einfluss zu haben. Ihre Aktivierung hat eine verminderte Expression von GLP-1 Rezeptoren bei reduzierter mRNA-Expression zur Folge. Die Affinität der verbleibenden GLP-1 Rezeptoren ist unverändert (Fehmann et al. 1996b). Studien an Ratteninseln konnten keine Abnahme des GLP-1 Rezeptor mRNA-Spiegels nach intrazellulärem cAMP-Anstieg messen, aber nach Inkubation mit dem Glucocorticoid Dexamethason und bei hoher Glukosekonzentration (20mM bzw. 16,7mM) (Abrahamsen et al. 1995, Garcia-Flores et al. 2001). An der Insulinomzelllinie MIN6 bewirkte dagegen eine hohe Glukosekonzentration (22mM) eine gesteigerte Expression von GLP-1 Rezeptoren (Yamato et al. 1997). Dies zeigt, dass man nicht uneingeschränkt direkt von Ergebnissen bei Tumorzellen auf Gegebenheiten an gesunden Zellen schliessen darf. Die Transkription des GLP-1 Rezeptorgens wird ausserdem zellspezifisch von bestimmten Faktoren geregelt. Es konnte ein distales zellspezifisches silencer Element (DCS) nachgewiesen werden, das in humanen Fibroblasten und α -Zellen des Pankreas, aber nicht in β - und δ -Zellen des Pankreas die Transkription des GLP-1 Rezeptorgens unterdrückt (Galehshahi et al. 2000).

Der Promoter des GLP-1 Rezeptors befindet sich 3000 Basenpaare vor der kodierten Sequenz und enthält regulatorische Elemente für die gewebespezifische Transkription (Lankat-Buttgereit et al. 1997). Am Promoter sind Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren nachgewiesen worden. Zwei Stellen für Sp1, das die Transkription fördert, und eine Stelle für Sp3, das die Transkription hemmt (Wildhage et al. 1999). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die basale Aktivität des GLP-1 Rezeptorpromoters durch gewebe- und zellspezifische Faktoren, die negativ auf ihn wirken, beeinflusst wird (Galehshahi et al. 1998).

Um den Mechanismus der Desensibilisierung des GLP-1 Rezeptors zu untersuchen, wurden insulinproduzierende β -TC3 Zellen mit GLP-1 inkubiert. Das dabei verwendete Nährmedium enthielt 11,2 mM Glukose. Dies bewirkt eine intrazelluläre Freisetzung von Ca^{2+} , die schliesslich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ aktivieren und so die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration steigt. Nach 5 min GLP-1 Exposition desensibilisiert der GLP-1 Rezeptor und GLP-1 ist nicht mehr in der Lage, die Ca^{2+} -Konzentration zu steigern. Wenn danach die GLP-1 Exposition unterbrochen wird, erlangt der GLP-1 Rezeptor seine volle Sensibilität nach 20 min. wieder. Diese Desensibilisierung scheint nicht durch die PKA, Ca^{2+} -aktivierte Kinasen oder Phosphatasen vermittelt zu werden. Möglicherweise spielt auch hier die PKC eine Rolle (s.u.) (Gromada et al. 1996). In einer weiteren Studie bewirkte GLP-1 eine Desensibilisierung seines Rezeptors, die eine 20%ige Reduktion der maximalen cAMP-Antwort nach sich zieht. Die Aktivierung der PKC verursacht eine 30%ige Reduktion der maximalen cAMP-Antwort. Diese beiden Effekte wirkten additiv und basieren auf der Phosphorylierung des GLP-1 Rezeptors innerhalb der letzten 33 Aminosäuren des intrazellulären C-Terminus. Eine GLP-1 Rezeptormutante, der die letzten 33 Aminosäuren fehlen, konnte weder durch GLP-1 noch durch den PKC-Aktivator desensibilisiert werden (Widmann et al. 1996a). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass der Ort dieser Phosphorylierung die Serinpaare an Position 431/432, 441/442, 444/445, und 451/452 sind (Widmann et al. 1996b).

Andererseits bewirkte eine chronische Exposition von Ratteninselzellen mit GLP-1 (100nM) bezüglich der Insulinausschüttung keine Desensibilisierung der Inselzellen bei anschliessender Exposition von 20mM Glukose (Zawalich et al. 1996). Um zu untersuchen, ob die Dauerstimulation des GLP-1 Rezeptors eine Desensibilisierung zur Folge hat, wurden transgene Mäuse gezüchtet (MT-Ex-Mäuse), bei denen der GLP-1 Agonist Exendin-4 vermehrt produziert wird. Trotz des ständig erhöhten Exendin-4 Spiegels konnte eine normale Glukosehomöostase, keine Gewichtsveränderung oder verminderte Nahrungsaufnahme und keine Massenzunahme von Inselzellen (obwohl es Hinweise gibt, dass Exendin-4 dies bewirkt (s.o.)) in den Mäusen festgestellt werden (Baggio et al. 2000). Beim Menschen verursacht die Gabe von GLP-1 ebenso keine Desensibilisierung; auch nicht nach einem längeren Zeitraum (Meneilly et al. 2003).

Die Phosphorylierung des C-Terminus des Rezeptors ist auch bei der Aufnahme des GLP-1/GLP-1 Rezeptor-Komplexes in die Zelle beteiligt (Widmann et al. 1997).

Nachdem GLP-1 an den Rezeptor bindet, wird der GLP-1/GLP-1 Rezeptor-Komplex von der Zelle aufgenommen. Während GLP-1 in Lysosomen degradiert wird, wandert der Rezeptor zur Zelloberfläche zurück (Göke,-R et al. 1989c, Widmann et al. 1995).

K. GLP-1 als Therapeutikum für Diabetes mellitus

1. Klinische Studien

Aus dem oben Dargelegten ergibt sich, dass GLP-1 im Vergleich zu herkömmlichen Therapeutika für Diabetes mellitus Typ 2 verschiedene Vorteile hat:

1. Glukoseabhängige Stimulation der Insulinbiosynthese und –sekretion
2. Stimulation der β -Zellneogenese, Hemmung der β -Zellapoptose
3. Senkung des Glukagonspiegels
4. Verlangsamung der Magenentleerung
5. reduzierte Nahrungsaufnahme, Gewichtsabnahme
6. mögliche verbesserte Insulinsensitivität und Glukoseutilisation

In der Praxis konnte gezeigt werden, dass GLP-1 bei Typ 2 Diabetikern i.v., subkutan oder bukal verabreicht effektiv den Glukosespiegel und das HbA1c senkt, die Magenentleerung verlangsamt und das Hungergefühl und die Nahrungsaufnahme verringert (Nauck et al. 1993a, Elahi et al. 1994, Byrne et al. 1998, Gutniak et al. 1992, 1994, 1996, Nauck et al. 1993c, 1996, 1997a, 1998, Willms et al. 1996, 1998, Schirra et al. 1998b, Ahren et al. 1997, Nathan et al. 1992, Rachman et al. 1996, 1997, Todd et al. 1997, 1998, Juntti-Berggren et al. 1996, Toft-Nielsen et al. 1999, Vilsboll et al. 2001).

Zwar wurde bei gesunden Probanden nach i.v.- oder subkutaner Verabreichung von GLP-1 eine zeitweilige Hypoglykämie festgestellt (Edwards et al. 1998, Vilsboll et al. 2001, Toft-Nielsen et al. 1998), diese trat aber bei der Behandlung von Typ 2 Diabetikern nicht auf (Vilsboll et al. 2001). Zudem konnte in den klinischen Studien auch gezeigt werden, dass GLP-1 bei Typ 2 Diabetikern den VLDL-Spiegel senkt (Juntti-Berggren et al. 1996). Auch nach drei Wochen Therapie konnte keine Tachyphylaxie festgestellt werden (Todd et al. 1997, 1998). Es war sogar bei primärem und sekundärem Versagen einer Sulfonylharnstofftherapie wirksam (Gutniak et al. 1996, Nauck et al. 1997a, 1998).

Eine kontinuierliche Infusion von GLP-1 war bei Typ 2 Diabetikern sowohl bei Tag als auch bei Nacht wirksam (Rachman et al. 1996, 1997, Toft-Nielsen et al. 1999), mit dem Abbruch der Infusion stoppte aber auch die Wirkung (Willms et al. 1998).

Es wurde zudem berichtet, dass GLP-1 auch bei Typ 1 Diabetikern den Glukosespiegel senken kann, was vermutlich auf die glukagonhemmende Wirkung zurückzuführen ist (Creutzfeldt et al. 1996, Gutniak et al. 1992).

2. Nebenwirkungen

Für GLP-1 konnten in physiologischen Dosen nach subkutaner Injektion von 0,15 nmol/kg Körpergewicht bei gesunden Probanden keine Nebenwirkungen festgestellt werden. Erst bei Dosen über 0,15 nmol/kg Körpergewicht traten bei GLP-1 Plasmaspitzen Unwohlsein, Schwindel, Parästhesien, Hyperhydrosis, Übelkeit und Erbrechen auf (Ritzel et al. 1995). Eine schwerwiegendere Nebenwirkung trat bei der i.v.-Gabe bei Typ 2 Diabetikern auf. Eine Infusion von GLP-1, die zu einem Plasmaspiegel von ca. 70 pmol/l führte, bewirkte während des Verzehrs einer flüssigen Mahlzeit eine komplette Hemmung der Magenentleerung (Willms et al. 1996). Es ist aber möglich, dass die Hemmung der Magenentleerung mit fester Nahrung und subkutaner Applikation von GLP-1 (und damit langsamerer Anflutung) geringer wird (Schirra et al. 1996, 1997).

3. Probleme der Praktikabilität

Ein Problem bei der Verwendung von GLP-1 als Therapeutikum ist seine geringe Halbwertszeit in vivo von 1-2 min (Kieffer et al. 1995). Wie oben beschrieben spaltet die DPP IV das Histidin-Alanin Dipeptid N-terminal ab, womit die biologische Aktivität verlorenght (Kieffer et al. 1995, Hansen et al. 1999, Beauvais et al. 1997, Ahren et al. 2000). Transgene Mäuse mit eingeschränkter Glukosetoleranz, die Dipeptidylpeptidase IV-negativ sind (CD26 (-/-)), haben eine verbesserte Glukosetoleranz im Vergleich zu CD26 (+/+) Mäusen. Die zirkulierende GLP-1- und Insulinmenge steigt (Marguet et al. 2000). Die Inhibition von DDP IV durch einen DDP IV-Antagonisten [NVP-DPP728 (Balkan et al. 1999), Isoleuzin-Thiazolidid oral (Pederson et al.1998, Pauly et al. 1999)] steigert bei „fatty“ Zucker-Ratten und Schweinen (Valin-Pyrolidid (Deacon et al. 1998a)) den GLP-1 Spiegel und verbessert

die orale Glukosetoleranz. Diese Antagonisten stellen eine Möglichkeit dar, die Halbwertszeit von GLP-1 zu verlängern (Holst et al. 1998). Andererseits konnte gezeigt werden, dass Analoga des GLP-1 auch zu einer Verlängerung der Halbwertszeit und verbesserten Wirkung des GLP-1 führen (Xiao et al. 2001, O'Harte et al. 2001, Gallwitz et al. 2000, Siegel et al. 1999, Ritzel et al. 1998, Deacon et al. 1998b, Burcelin et al. 1999). Sie wurden verschiedenartig am N-terminalen Ende verändert, um so resistent gegen den Abbau durch die DPP IV zu werden. Vor allem wurde das Alanin an der zweiten Position gegen verschiedene andere Aminosäuren ausgetauscht.

Eine andere Möglichkeit, die Halbwertszeit von GLP-1 zu verlängern, ist eine Bindung an Serumalbumin. Humanes Serumalbumin hat eine Plasmahalbwertszeit von ~19 Tagen (Peters 1985). Es schützt das Peptid vor Abbau und sorgt so für eine verlängerte Wirkung. Um eine Bindung an Serumalbumin zu erreichen, wurde GLP-1 mit Fettsäuren derivatisiert. Dabei wurde festgestellt, dass Derivate mit nur einer Fettsäure zwischen 12 und 16 C-Atomen am C-Terminus des GLP-1 die beste Struktur-Aktivitätsbeziehung haben. Wenn aber der N-Terminus zur verbesserten metabolischen Stabilität gleichzeitig verändert wurde, führte dies zum kompletten Wirkungsverlust der Fettsäurederivate (Knudsen et al. 2000).

CJC-1131 ist ein DPP IV-resistentes GLP-1 Analogon, das mit einer Aminosäure eine kovalente Bindung mit Albumin eingeht (Kim et al. 2003). An diabetischen Mäusen konnten Kim et al. zeigen, dass CJC-1131 über den GLP-1 Rezeptor den Glukosespiegel senkt, aber eine chronische Hyperglykämie nicht behebt.

Liraglutid ist ein acetyliertes GLP-1 Analogon, das eine nicht kovalente Bindung mit Albumin eingeht. Es wird zur Zeit in Phase-2-Studien untersucht. Liraglutid hat ein besseres pharmakokinetisches Profil als GLP-1 und müsste bei einer Halbwertszeit von 14-18 Stunden nach subkutaner Injektion nur einmal täglich verabreicht werden (Elbrond et al. 2002, Degn et al. 2004).

Albugon ist ein rekombinantes DPP IV-resistentes GLP-1, das in die Sequenz des Humanalbumins eingebaut ist. Versuche von Baggio et al. an Mäusen konnten die Wirkung von Albugon bestätigen (Baggio et al. 2004).

Eine verbesserte Wirkung an den β -Zellen konnte auch durch die parallele Verabreichung von Succinylsäuredimethylester mit GLP-1 erzielt werden (Leclercq-Meyer et al. 1996, Garcia-Martinez et al. 2000).

Ein anderes Problem ist die schlechte Absorption aus dem Darm, was problematisch für eine mögliche orale Applikationsform ist. Eine verbesserte Absorption konnte z.B. durch Ummantelung eines wirksamen Analogons mit Poly(lactide-co-glycolid)-COOH bewirkt werden (Joseph et al. 2000). Das nicht ummantelte Analogon hatte oral keinen Effekt.

Bei der subkutanen Applikation von GLP-1 ist problematisch, dass GLP-1 zu schnell angeflutet wird. Insulin erreicht je nach Applikationsform seine Konzentrationsspitze im Plasma nach 60 bis 90 min der Injektion (Brange et al. 1990), während GLP-1 ähnlich dem Glukagon schon nach 20 min im Plasma seine Spitzenkonzentration erreicht (Muhlhauser et al. 1985, Byrne et al. 1997). Um die Absorption zu verlangsamen, ist es nötig, die Eigenschaften des Injektats zu verändern. Möglich wäre z.B. eine Beigabe von vasokonstriktorisch wirkenden Adjuvantien oder eher die Verwendung einer Suspension als einer Lösung, wie es bei intermediär wirkenden Insulinpräparaten der Fall ist (Byrne et al. 1997). Es wurde die Präzipitation von GLP-1 in Gegenwart von Protamin, Zink oder Phenol beschrieben (Kim et al. 1995). Die Zugabe von Protamin bewirkt die Bildung eines kaum löslichen Proteinpräzipitats, das die Absorption des Proteins verlangsamt.

L. Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen Peptid und Rezeptor

Um die positiven Eigenschaften des GLP-1 als Therapeutikum nutzen zu können, muss es gut intestinal absorbierbar sein, um oral verabreicht werden zu können. Weiterhin muss es im Blut langsam anfluten und eine lange Halbwertszeit haben, damit es nicht oft eingenommen werden muss. Zudem muss es mit möglichst geringen Nebenwirkungen für Niere und Leber metabolisiert werden. Schliesslich sollte es möglichst kosteneffektiv herstellbar sein.

Um diese Schwierigkeiten zu überwinden, ist es nötig, die Struktur-Wirkungsbeziehung von Peptid und Rezeptor besser zu verstehen, um auf der Basis dieser Kenntnisse ein möglichst ideales neues Therapeutikum für die Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 herstellen zu können.

So konnte für das Peptid gezeigt werden, dass es einen Grossteil seiner insulinotropen Wirkung an der Insulinomzelllinie BRIN-BD11 verliert, wenn GLP-1(7-36)amid am N-terminalen Ende glykosiliert wird (O'Harte et al. 1998). Das Vorhandensein von

Histidin am N-Terminus von GLP-1 ist wegen der positiven Ladung am Imidazolring essentiell für die GLP-1 Wirkung (Hareter et al. 1997).

Um mehr über die Interaktion zwischen Peptid und Rezeptor zu lernen, wurden verschiedene GLP-1/GIP-Chimäre hergestellt. Dabei wurde festgestellt, dass der N-Terminus von GLP-1 für die Rezeptoraffinität wichtiger ist als der C-Terminus (Gallwitz et al. 1996).

Beim GLP-1 Rezeptor wurde an dessen isolierter N-terminaler Domäne gezeigt, dass diese direkt an der GLP-1 Bindung beteiligt ist (Wilmen et al. 1996). Der Austausch des Tryptophans an Position 39 des N-Terminus des GLP-1 Rezeptors mit Alanin oder auch Phenylalanin bewirkt einen kompletten Verlust der Bindung von GLP-1 an den Rezeptor. Eine Verschiebung von Lysin von Position 38 auf Position 37 bewirkt in dieser nicht konservierten Region des Rezeptors eine Verbesserung der Bindungsaffinität zu GLP-1 (Van-Eyyl et al. 1996). Weiterhin gibt es in der N-terminalen Domäne des GLP-1 Rezeptors sechs Tryptophane. Um zu untersuchen, ob diese wichtig für die Bindung des GLP-1 sind, wurden sie jeweils gegen Alanin ausgetauscht. Es wurde festgestellt, dass fünf von sechs Tryptophanen essentiell für die GLP-1 Bindung sind (Wilmen et al. 1997). Auch eine Chimäre des GLP-1 Rezeptors, die an Positionen 29-32 des N-Terminus die Aminosäuren des analogen Teils des Glukagon-Rezeptors aufweist, verliert nicht nur die Affinität zu GLP-1 oder Exendin(9-39), sondern hat eine gesteigerte Affinität zu Glukagon. Der N-Terminus des GLP-1 Rezeptors ist also nicht nur für die Affinität zu seinem Liganden, sondern auch für die Spezifität entscheidend (Graziano et al. 1996). Diese Untersuchung bestätigte auch eine Studie, bei der Glukagon/GLP-1 Rezeptor-Chimäre hergestellt wurden, um die Struktur-Wirkungsbeziehung von Glukagon und Glukagon Rezeptor zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass am Glukagon Rezeptor die proximale Hälfte der N-terminalen Domäne, die erste extrazelluläre Schleife und die 3., 4. und 6. transmembranäre Domäne wichtig für die spezifische Bindung sind (Buggy et al. 1995).

Nicht nur die N-terminale Domäne des GLP-1 Rezeptors ist für die Bindung wichtig, sondern auch geladene Aminosäuren der 1. extrazelluläre Schleife, bzw. am Übergang zwischen 2. transmembranärer Domäne und 1. extrazellulärer Schleife (Xiao et al. 2000).

Durch Aminosäureaustausch gegen die eher neutrale Aminosäure Alanin konnte am GLP-1 Rezeptor festgestellt werden, dass vor allem der Übergang von der 5.

transmembranären Helix zur 3. intrazellulären Schleife besonders wichtig für die Bindung des Gs-Proteins ist, das die Adenylatzyklase aktiviert (Mathi et al. 1997). Die GLP-1 Rezeptormutanten IC3-1 (Deletion von K334-L335-K336; Austauschversuche mit Alanin ergaben, dass scheinbar K334 besonders wichtig ist.) und DM-1 (Deletion von V331-I332-A333) sind an der 3. zytoplasmatischen Schleife so verändert, dass keine Koppelung der Adenylatzyklase mehr stattfindet. Genannte Mutationen exprimiert in HIT-T15-Zellen führen zum Verlust der GLP-1-stimulierten cAMP-Produktion und Insulinsekretion. Diese Untersuchung zeigt auch, dass die Wirkung vom GLP-1 an der β -Zelle vom cAMP-Anstieg abhängt (Salapatek et al. 1999, Takhar et al. 1996).

Punktmutationen am GLP-1 Rezeptor ergaben, dass die 1. intrazelluläre Schleife vor allem für die Bindungsaffinität wichtig ist. Die 3. intrazelluläre Schleife scheint für die Affinität weniger bedeutsam zu sein, aber ist für die Aktivierung der Adenylatzyklase essentiell (Heller,-R-S et al. 1996).

Um dem Ziel der Entwicklung neuer GLP-1 Agonisten näher zu kommen, wurden folgende Überlegungen angestellt:

Fragestellung

Wie oben beschrieben gehört der GLP-1 Rezeptor zur Familie der G-Protein-bindenden Rezeptoren und in dieser Familie zur Klasse B, den Sekretin-ähnlichen Rezeptoren (Horn et al. 2001). Um die Struktur-Wirkungsbeziehung von GLP-1 und GLP-1 Rezeptor besser verstehen zu lernen, macht es Sinn, die Struktur-Wirkungsbeziehung anderer Klasse B Rezeptoren und ihrer Peptide zu betrachten und daraus mögliche Rückschlüsse für den GLP-1 Rezeptor zu ziehen und diese dann zu untersuchen.

Wenn man in der Klasse B der G-Protein-bindenden Rezeptoren den Übergang von der 2. transmembranären Domäne zur 1. extrazellulären Schleife der unterschiedlichen Rezeptoren vergleicht, fällt auf, dass dort die Homologie der gesamten Rezeptorfamilie sehr hoch ist. Einzig das Asparagin an Position 192 (N192) des Sekretin Rezeptors und das Isoleucin an Position 195 (I195) des Glukagon Rezeptors sind nicht konserviert (Abb.3).

Rezeptor	Aminosäuresequenz																			
PH	-	F	L	S	F	M	L	R	A	A	S	<i>I</i>	<i>F</i>	V	K	D	A	V	L	-
Sekretin	-	F	V	S	F	<i>I</i>	L	R	A	L	S	N	<i>F</i>	<i>I</i>	K	D	M	A	L	-
VIP	-	F	M	S	F	<i>I</i>	L	R	A	T	A	V	<i>F</i>	<i>I</i>	K	D	M	A	L	-
GLP-1	-	F	A	S	F	<i>I</i>	L	R	A	L	S	V	<i>F</i>	<i>I</i>	K	D	A	A	L	-
Glukagon	-	F	A	S	F	V	L	K	A	G	S	V	L	V	I	D	W	L	L	-

Abb.3: Aminosäuresequenzvergleich Klasse B G-Protein-bindender Rezeptoren aus dem Bereich der 2. transmembranären Domäne. Konservierte Aminosäuren sind fett hervorgehoben. Ähnliche Aminosäuren sind kursiv hervorgehoben. N192 des Sekretin Rezeptors und I195 des Glukagon Rezeptors sind unterlegt (Segre et al. 1993).

Dass dieser Bereich im Glukagon Rezeptor wichtig für die spezifische Bindung von Glukagon ist, konnte bereits gezeigt werden (Buggy et al. 1995). Beeindruckend ist, dass der alleinige Austausch einer dieser 2 nicht konservierten Aminosäuren, nämlich Asparagin (N192) im Sekretin Rezeptor, mit der dieser Position entsprechenden Aminosäure im Parathormon Rezeptor, Isoleucin (I234), zum kompletten Selektivitätsverlust dieser Rezeptoren bezüglich Sekretin und PH führen. Sekretin bindet nun an den um diese eine Aminosäure veränderten Parathormon Rezeptor und umgekehrt (Turner et al. 1996). Das bedeutet, dass für diese zwei Rezeptoren diese einzelne Aminosäure essentiell für die spezifische Bindung des entsprechenden Peptids ist.

Obwohl der GLP-1 Rezeptor zu 47% identisch mit dem Glukagon Rezeptor ist, haben ihre Hormone sehr unterschiedliche Wirkungen; im Glukosehaushalt sogar entgegengesetzte Wirkungen. Daher wäre zu vermuten, dass möglicherweise sogar einzelne Aminosäuren der beiden Rezeptoren für eine spezifische Bindung verantwortlich sind. Basierend auf diesen Untersuchungen wird die erste Hypothese aufgestellt.

1. Hypothese:

Die Aminosäuren Isoleucin (I195) des Glukagon Rezeptors und die der Position entsprechende Aminosäure Lysin 197 (K197) des GLP-1 Rezeptors sind essentiell für die spezifische Bindung zu ihren Peptiden.

Bezüglich der Interaktion von Glukagon und GLP-1 und ihren Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass die nicht konservierten Aminosäuren des N-Terminus des Glukagons für die selektive Bindung von Glukagon und die nicht konservierten Aminosäuren des C-Terminus des GLP-1 für die selektive Bindung von GLP-1 entscheidend sind (Hjorth et al. 1994).

Vilardaga et al. fanden heraus, dass beim Sekretin und seinem Rezeptor die Aminosäure Asparaginsäure an Position 3 (D3) des Sekretins vom Lysin an Position 195 (K195) des Sekretin Rezeptors erkannt wird und so zur Aktivierung der Adenylatzyklase beiträgt (Vilardaga et al. 1996). Wenn man sich die Aminosäuren an Position 3 der Glukagon-verwandten Peptide anschaut, zu denen auch Sekretin gehört, findet man durchgehend saure Aminosäuren wie Asparaginsäure, Glutaminsäure und Glutamin (s. Abb.1 (Seite 13), Adelhorst et al. 1994). GLP-1 und Glukagon stimmen in ihren Aminosäuresequenzen in 48% überein. Aber an der beschriebenen 3. Position (im GLP-1 entsprechend 9. Position) unterscheiden sich die beiden Peptide. GLP-1 hat dort Glutaminsäure (E9) und Glukagon hat dort als einziges Peptid der gesamten Gruppe Glutamin (Q3). Basierend auf diesen Untersuchungen wird die zweite Hypothese aufgestellt.

2. Hypothese:

Die Glutaminsäure E9 vom GLP-1 wird spezifisch von der entsprechenden Aminosäure Lysin K197 des GLP-1 Rezeptors erkannt. Das Glutamin Q3 vom

Glukagon wird spezifisch von der entsprechenden Aminosäure Isoleucin I195 des Glukagon Rezeptors erkannt.

Diese beiden Hypothesen wurden untersucht, indem Chimäre von Glukagon und GLP-1 und ihren Rezeptoren hergestellt wurden, bei denen die entsprechenden Aminosäuren miteinander ausgetauscht wurden (Abb.4). Mit den entsprechenden Wildtyp-Peptiden und Wildtyp- Rezeptoren standen 4 Peptide und 4 Rezeptoren zur Untersuchung zur Verfügung:

GLP-1, [Q9]-GLP-1, Glukagon, [E3]-Glukagon

GLP-1 Rezeptor, [I197]-GLP-1 Rezeptor, Glukagon Rezeptor, [K195]-Glukagon Rezeptor.

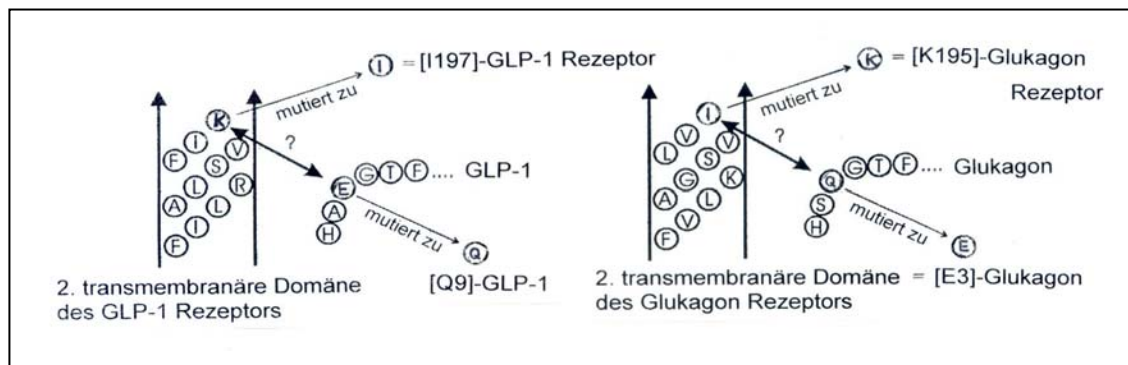


Abb.4: graphische Darstellung des Versuchskonzepts

Alle möglichen Kombinationen von Peptid und Rezeptor, also 16, wurden daraufhin untersucht, ob Peptid und Rezeptor eine Bindung eingehen und ob das Peptid am Rezeptor eine cAMP-Produktion der Zelle auslösen kann.

Material und Methoden

A. Material

Die verwendeten Chemikalien waren von höchstem Reinheitsgrad und wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Für die Mutagenese wurden Oligonukleotide von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) verwendet und die übrigen Produkte waren von den Firmen Stratagene (Heidelberg), Quiagen (Hilden), Fermentas (St. Leon-Rot), Boehringer (Mannheim) und Macherey-Nagel (Düren). Iodogen stammte von Pierce (Niederlande). Na¹²⁵I und ¹²⁵Iod-markiertes Glukagon wurden von Amersham-Buchler (Braunschweig) bezogen. Die Firma Bachem (Heidelberg) lieferte humanes Glukagon (1-29) und GLP-1(7-36)-NH₂. cAMP-Radioimmunoassays waren von Immunotech (Hamburg) und HPLC Säulen Nova-Pak-C₁₈ von Waters Associates (Milford, USA). Seren, Medien und weitere Reagenzien für die Zellkultur wurden sämtlich von PAA Laboratories (Linz, Österreich) bezogen. Der Antikörper Anti-V5-HRP für den Western-Blot wurde von Invitrogen (Leek, Niederlande) gekauft. Zentrifugen und Brutschrank stammten von Beckman Instruments (Palo Alto, USA) und Heraeus Instruments (Hanau).

1. Pufferlösungen und Nährmedien

(in alphabetischer Ordnung und wenn nicht anders angegeben in 1 x Konzentration)

Agarplatten: 10 g Bacto-Tryptophan, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Bacto-Agar
auf 1 l Aqua dest.

Denaturierungsmix: 2 M NaOH, 2 mM EDTA

Farbreagenz (DNA-Gesamtbestimmung): 20 ml Eisessig, 665 mg Diphenylamin,
670 µl H₂SO₄ konz., mit Aqua dest auf 25 ml
auffüllen, 170 µl Acetaldehyd dazugeben

HBS-Puffer (2 x): 280mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 12 mM
Dextrose, 50 mM Hepes, pH 7,05

Homogenisationspuffer: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 30 mM NaCl, einstellen auf pH 7,4, 5 μ M PMSF (50 μ l einer 0,1 M Lsg) dazugeben

Ladepuffer (Agarosegel): 10 % Bromphenolblaulösung (10 %ig), 10 % TBE, 50 % Glycerol, 30 % Aqua dest.

Laufpuffer (SDS-PAGE) (10 x): 30,3 g/l Tris Base, 144 g/l Glycin, 10 g/l SDS

LB-Medium: 10 g Bacto-Tryptophan, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l Aqua dest. (autoklavieren)

KRB (Krebs-Ringer-Puffer): 25 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM KCl, 1 mM Na-EDTA, 15 mM CH₃COONa, pH 7,4

N2-Puffer: 100 mM Tris, 15 % Ethanol und 900 mM KCl eingestellt mit H₃PO₄ auf pH 6,3

N3-Puffer: 100 mM Tris, 15 % Ethanol und 1150 mM KCl eingestellt mit H₃PO₄ auf pH 6,3

N5-Puffer: 100 mM Tris, 15 % Ethanol und 1000 mM KCl eingestellt mit H₃PO₄ auf pH 8,5

PB-Puffer: 5 M GuHCl (Guanidinhydrochlorid), 30 % Isopropanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

PBS-EDTA-Puffer: 8,0 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,2 g/l KH₂PO₄, 0,2 g/l EDTA, pH 7,4

PCA (0,5 M): 4,3 ml PCA 70 %/100 ml H₂O

PE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 80 % Ethanol, pH 7,5

Probenpuffer (SDS-PAGE) (4 x): 2 g Tris-HCl, 4 g SDS, 30 ml Aqua dest., 25 mg Bromphenolblau, mit Glycerol auf 50 ml auffüllen, pH 6,8 (pH vor Zugabe von SDS einstellen!)

QX-1-Puffer: 7 mM NaClO₄, 30 mM NaAc, 0,1 mM Xylit, pH 5,1

S1-Puffer: 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNase A/ml, pH 8,0

S2-Puffer: 200 mM NaOH, 1 % SDS

S3-Puffer: 2,80 M KAc, pH 5,1

Sammelpuffer: 0,5 M Tris Base, 0,4 % SDS, pH 6,8

Sequenzierung Puffer: 40 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, pH 7,5

Stop-Lösung: 95 % Formamid, 220 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylen Zyanol

TBE-Puffer (5 x): 0,45 M Tris-borat (Tris-Base), 0,01 M EDTA

TBS-Puffer (10 x): 24,2 g Tris Base, 80 g NaCl auf 1 l Aqua dest., pH 7,6

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0

Transfer-Puffer: 100 ml 10 x Laufpuffer (SDS-PAGE), 200 ml Methanol, 700 ml Aqua dest.

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris Base, 0,4 % SDS, pH 8,8

TSS (in LB): 10 % PEG (Polyethylenglucol MG: 3,350), 5 % DMSO, 50 mM MgCl₂

2. verwendete Oligonukleotide

Die silent mutation lässt eine Schnittstelle für eine bestimmte Endonuklease entstehen. Bei der Mutation des GLP-1 Rezeptors ist dies Afl II. Bei der Mutation des Glukagon Rezeptors handelt es sich um die Endonuklease Spe I. Im Primer ist die entsprechende Schnittstelle markiert. Kursiv hervorgehoben ist die Erkennungssequenz der Endonuklease. Die von der Originalsequenz abweichenden Nukleotide sind fett dargestellt.

Primer für rekombinante PCR der GLP-1-rec-mut K197I

Anna I-sense: 5'-GTC TTC ATC ATA GAC GCT GCC *C***TT** AAG TGG-3'

Anna I-antisense: 5'-ATA CAT CCA *C***TT** AAG GGC AGC GTC TAT GAT GAA-3'

719-sense: 5'-GTG CAC CCG TAC CTT TGG-3'

218-antisense: 5'-TGT CCA AAC TCA TCA ATG TAT CTT ATC-3'

Primer für rekombinante PCR der Glukagon-rec-mut I195K

Anna II-sense: 5'-GCT GGC TCT GTA *C***TA** GTC AAA GAT TGG CTG CTC-3'

Anna II-antisense: 5'-GAG CAG CCA ATC **TTT** GAC *L* **TAG** TAC AGA GCC AGC-3'

719-sense: s.o.

218-antisense: s.o.

Primer zur Sequenzierung der GLP-1-rec-mut K197I in PTEJ-8

PTEJ-8-Start-sense: 5'-ATT GTC CGC TAA ATT CTG GCC G-3'

312-antisense: 5`-CAC ACT ACT GGC CCA CGG-3`

W₂-sense: 5`-CTA CGC CTG CTG GCC AGA TGG-3`

W₆-sense: 5`-GCC TGC CCT GGA GGG ACC TGT CGG-3`

Primer zur Sequenzierung der Glukagon-rec-mut I195K in pcDNA3.1

T₇-sense: 5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3`

AFS 1-sense: 5`-ACC TAC TGA GCT GGT CTG CAA-3`

AFS 2-sense: 5`-GAT GGA TGA TGA CGA GAT CGA-3`

AFS 3-sense: 5`-AGA AGA TTG GAG ATG ACC TCA-3`

AFS 4-antisense: 5`-CTG GTA GCT GCT ATA CAT CTT-3`

Primer zur Sequenzierung der GLP-1-rec-mut K197I nach Umklonierung in pcDNA3.1

pcDNA3.1-start-sense

312-antisense: 5`-CAC ACT ACT GGC CCA CGG-3`

W₂-sense: 5`-CTA CGC CTG CTG GCC AGA TGG-3`

W₆-sense: 5`-GCC TGC CCT GGA GGG ACC TGT CGG-3`

pcDNA3.1-end-antisense

Primer für PCR zum Umklonieren von GLP-1-rec-wildtyp bzw.-mut aus pcDNA3.1 in pcDNA3.1V5 His B

Epi Tag 1-sense: 5'-CGG AAG CTT TCC GCC GCC ACC ATG GCC GTC-3'

Epi Tag/GFP-3-antisense: 5'-CGC GGC TCC GCA GGA ATT TTG GCA GGT GGC-3'

Primer für PCR zum Umklonieren von Glukagon-rec-wildtyp bzw.-mut aus pcDNA3.1 in pcDNA3.1V5 His B

V5 Gluc-sense: 5'-CGG AAG CTT TCC GCC GCC ACC ATG CTC CTC ACC CAG CTC CAC-3'

GFP/V5 Gluc-antisense: 5'-GGT GGG GCT GTC AGC CAG CCT-3'

*B. Methoden***1. Rekombinante PCR mit Kontrolle durch silent mutation****Pfu-DNA-Polymerase**

Die für diese Methode verwendete Pfu-DNA-Polymerase wurde aus dem thermophilen marinen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* isoliert. Sie besitzt eine 3'=>5'-Exonuclease-Proofreading-Aktivität. Diese Eigenschaft erhöht die Präzision der Polymerase erheblich. Im Vergleich mit der Taq-DNA-Polymerase ist die Genauigkeit etwa zwölfmal höher (Newton 1994).

Rekombinante PCR nach Higuchi (Higuchi 1990)

Die rekombinante PCR beruht auf folgendem Prinzip:

Eine Mutation wird dadurch ermöglicht, dass man für den Mutationsort Primer entwickelt, die in ihrer Nukleotidsequenz um die gewünschte Mutation verändert sind. Diese Primer lagern sich beim ersten Zyklus der PCR an das DNA-Template an, obwohl sie z.B. bei der Punktmutation eine Veränderung um 1-3 Nukleotide enthalten. Dadurch wird nun ein neues DNA-Template synthetisiert, das bereits an seinem einen Ende die Mutation enthält.

Im zweiten Zyklus der PCR lagern sich nun die Primer bevorzugt an die mutierte Vorlage, da sie perfekt auf diese passen. So werden in den weiteren Zyklen vor allem mutierte DNA-Stränge synthetisiert.

So kann man Mutationen am Ende eines DNA-Stranges einfügen. Um eine Mutation in die Mitte eines DNA-Stranges einzufügen, muss man das oben beschriebene Prinzip modifizieren.

Man bereitet 2 getrennte Ansätze für die 1. PCR. Zum ersten Ansatz gibt man einen Sense-Primer des 5`-Endes und einen Antisense-Primer mit veränderter Nukleotidsequenz der Mutationsstelle. Zum zweiten Ansatz gibt man einen Sense-Primer mit veränderter Nukleotidsequenz der Mutationsstelle und einen Antisense-Primer des 3`-Endes des DNA-Stranges. Nach dieser 1. PCR erhält man so zwei amplifizierte DNA-Stränge, die an je einem Ende die gewünschte Mutation enthalten und sich ausserdem an dieser Stelle überlappen.

Diese beiden Produkte werden durch ein präparatives Gel (s.u.) getrennt voneinander aufbereitet und dann beide als Vorlage für eine weitere, die 2. PCR, verwendet. Bei dieser fügt man nur noch den Sense-Primer des 5`-Endes und den Antisense-Primer des 3`-Endes hinzu. So erhält man schliesslich als amplifiziertes Produkt einen DNA-Strang mit der gewünschten Mutation in der Mitte (Abb.5).

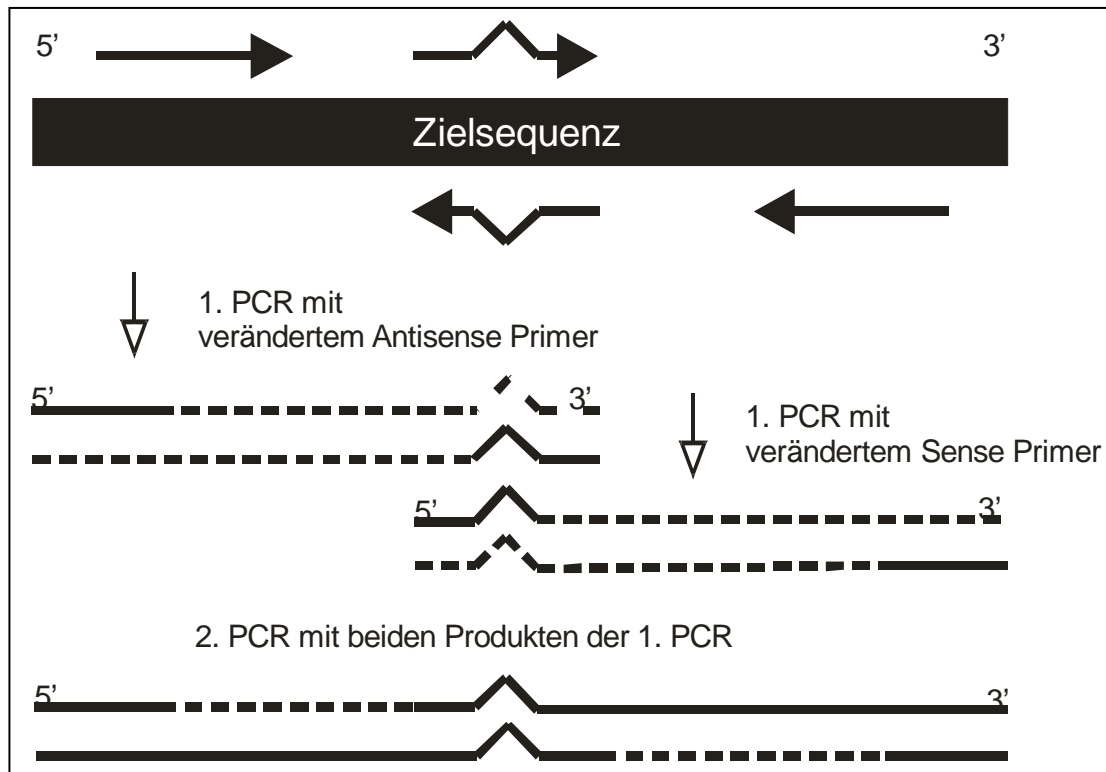


Abb.5: Rekombinante PCR

Kontrolle durch silent mutation

Zur Kontrolle des erfolgreichen Einfügens der gewünschten Mutation, ohne die DNA sofort sequenzieren zu müssen, kann man eine so genannte „silent mutation“ einfügen. Dies ist eine Punktmutation des DNA-Stranges, die die Aminosäuresequenz nicht verändert, aber eine Schnittstelle einer Restriktionsendonuklease hinzufügt oder entfernt. Wenn man so jeweils Wildtyp-DNA und Mutations-DNA mit diesem Enzym verdaut und anschliessend diese DNA-Stücke elektrophoretisch in einem Agarosegel auftrennt, kann man durch den Vergleich der entstandenen Bandenmuster mit grosser Wahrscheinlichkeit sagen, ob die eigentlich gewünschte Mutation ebenfalls eingebaut wurde oder nicht.

Je dichter die silent mutation an der gewünschten Mutation liegt, desto grösser ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Mutation auch eingebaut wurde, wenn man die silent mutation nachweisen kann. Deshalb versucht man, die Mutationsprimer so zu konstruieren, dass diese silent mutation möglichst dicht an der eigentlichen Mutation liegt. Eine spätere DNA-Sequenzierung sichert das Vorliegen der gewünschten Mutation ab.

PCR-Protokoll

10% DMSO

1x Pfu-Polymerase Puffer

0,2 mM dNTP

50 pmol sense primer

50 pmol antisense primer

0,1 µg Template (z.B. Wildtyp-DNA)

2,5 U Pfu-Polymerase

1. Zyklus:	Denaturierung:	94°C	5 min
	Hybridisierung:	55°C	5 min
	Synthese:	72°C	2 min

2.-28. Zyklus:	Denaturierung:	94°C	30 sec
	Hybridisierung:	55°C	1 min
	Synthese:	72°C	2 min

29. Zyklus:	Synthese:	72°C	5 min
-------------	-----------	------	-------

Ethanol-Fällung

Da man für den nächsten Schritt, das „präparative Gel“, die amplifizierte DNA in einem möglichst kleinen Volumen in die Gelkammern geben möchte, um bei der Gelextraktion nicht zuviel DNA zu verlieren, fällt man das PCR-Produkt mit Ethanol. Dabei geht auch DNA verloren, aber in geringerer Masse als bei der grossvolumigen Gelextraktion.

10Vol% NaAcetat 3M (zur Ansäuerung des PCR-Produktes, damit DNA als Salz leichter ausfällt)

250Vol% Ethanol 100%

10 min bei 16000 g zentrifugieren. Anschliessend wird das Pellet in 20 µl Aqua dest. aufgenommen.

Präparatives Gel

Um die gewünschte amplifizierte DNA von den Primern und möglichen anderen falsch synthetisierten DNA-Stücken zu trennen, wird das gefällte PCR-Produkt auf ein 1%iges Agarosegel (versetzt mit 0,01Vol% Ethidiumbromid) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA, die so unter UV-Bestrahlung sichtbar wird. Anhand zusätzlich aufgetragener DNA-Marker kann die amplifizierte DNA identifiziert werden.

Sie wird aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick-Gelextraktionskits von diesem getrennt:

Die Gelstücke werden in 3 Volumen QX-1-Puffer 10min bei 50°C gelöst. Diese Lösung wird auf eine Qiaquick-Säule gegeben und bei 16000 g 1 min zentrifugiert. Danach wird einmal mit QX-1-Puffer und einmal mit PE-Puffer gewaschen. Dann wird die DNA mit 50 µl 10mM Tris-HCl pH 8,5 aus der Säule eluiert.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass bei hohem Salzgehalt, hier durch den QX-1-Puffer, die Silicamembran der Säule die DNA als Salz spezifisch bindet. Durch eine Niedrigsalzlösung, hier Tris-HCl, löst sich die DNA wieder in dieser Lösung und wird so aus der Säule ausgespült.

Überprüfen der silent mutation durch Verdau der DNA und anschließender Gelelektrophorese

Die aus der 2. PCR gewonnene DNA wird wiederum mit Ethanol gefällt, um das Volumen zu verringern und die Probe von Proteinen und Salzen zu reinigen. 1µl der 20 µl wird zum Überprüfen der silent mutation mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease im dazugehörigen Puffer verdaut.

Nach dem Verdau wird die Probe auf ein 1%iges Agarosegel (ethidiumbromidversetzt) gegen einen DNA-Marker, eine unverdaute Probe Wildtyp-DNA und eine mit dem gleichen Enzym verdaute Probe Wildtyp-DNA aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Durch den Vergleich der Bandenmuster kann man feststellen, ob die silent mutation eingebaut wurde.

2. Ligation der rekombinanten DNA in den Vektor pTEJ-8 bzw. pcDNA3.1+

Präparativer Verdau von PCR-Produkt und Vektoren mit Wildtyp-DNA

Die rekombinante DNA, die mit Hilfe der PCR hergestellt wurde, soll nun in einen Vektor kloniert werden, damit sie mit Hilfe von E.coli vermehrt werden kann. Dabei möchte man das Risiko möglichst gering halten, dass eine während der PCR falsch eingebaute Mutation in den Vektor mit übernommen wird. Daher baut man nicht die DNA des gesamten Rezeptors ein, sondern schneidet ein kürzeres Stück aus dem PCR-Produkt aus, das die Mutation enthält. So muss man später auch nur dieses ausgeschnittene Stück sequenzieren, wenn man es in den Vektor kloniert hat. Aus dieser Tatsache folgt, dass man auch den Vektor mit der Wildtyp-DNA mit den gleichen Enzymen schneiden muss, damit man das ausgeschnittene Stück durch das rekombinante Stück ersetzen kann.

Ansonsten gelten die gleichen Bedingungen wie bei dem Verdau zur Überprüfung der silent mutation. Nach dem Verdau werden die einzelnen DNA-Fragmente durch ein präparatives Gel aufbereitet (s. "Präparatives Gel") und können dann für die Ligation verwendet werden.

Die rekombinante DNA des Glukagon-Rezeptors der Ratte wird direkt in den pcDNA3.1+ eingebaut, die des GLP-1-Rezeptors der Ratte muss erst wieder in den PTEJ-8 eingebaut werden, da es im pcDNA3.1+ keine passenden Schnittstellen gibt, ohne den Rezeptor gesamt einzubauen.

So muss man zwar nach der Sequenzierung den gesamten korrekt rekombinanten Rezeptor in den pcDNA3.1+ umklonieren, umgeht aber das höhere Risiko, erst bei der Sequenzierung Fehler in der nicht veränderten Sequenz zu finden.

Ligation der geschnittenen rekombinanten DNA (Insert) in die geschnittenen Vektoren

Insert/Vektor im Verhältnis 1:1

1 x Ligasepuffer

1 U T₄-Ligase

Der Ansatz wird bei 16°C über Nacht inkubiert.

Das Produkt der Ligation sind die punktmutierte DNA des GLP-1-Rezeptors der Ratte in pTEJ-8 und die punktmutierte DNA des Glukagon-Rezeptors der Ratte in pcDNA3.1+.

3. Erzeugung kompetenter Bakterien

Eine Übernachtskultur von Bakterien wird 1:100 in LB-Medium verdünnt und im Bakterienschüttler bei 37°C so lange wachsen gelassen, bis die optische Dichte der Bakterien bei 600 nm 0,3 beträgt. Dann wird die Lösung bei 4°C und 1000 g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Bakterienpellet wird in 1/10 des Ausgangsvolumens eiskalten TSS-Puffer resuspendiert.

Man aliquotiert die kompetenten Bakterien á 200µl und schockgefriert sie in Flüssigstickstoff.

Gelagert werden sie bei -80°C.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass im TSS DMSO (Dimethylsulfoxid) enthalten ist, das die Bakterien für die Aufnahme von DNA-Molekülen empfänglich macht (Ibelgaufits 1990).

4. Transformation

Man bereitet die Ansätze für das Ligationsprodukt, eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle. Die kompetenten Bakterien werden langsam auf Eis aufgetaut. Die Ligationsprodukte, 0,5 µg Wildtyp-DNA in Vektor (Positivkontrolle) und 0,5 µg geschnittener Vektor ohne Insert (Negativkontrolle) werden in je ein Bakterienaliquot pipettiert und 60 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock über 90 sec bei 42°C werden die Proben auf Eis gestellt und 500µl LB-Medium dazugegeben. Anschliessend werde die Bakterien für 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Dann werden die Bakterien auf vorher angewärmten ampicillinhaltigen 50µg/ml-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

5. DNA-Minipräparation ausgewählter Klone und Kontrolle auf silent mutation

DNA-Minipräparation

Von den auf der Agarplatte gewachsenen Klonen werden Kulturen in je 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (0,5mg/ml) angesetzt und über Nacht bei 37°C im Bakterenschüttler inkubiert.

Von den 3 ml überführt man jeweils 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß und bewahrt den Rest zum Animpfen neuer Kulturen bei 4°C auf.

Die Bakterien werden bei 3500 g 3 min abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen.

Zur Präparation der amplifizierten DNA wurde der „Nucleo Spin“-kit (Macherey-Nagel) verwendet.

Kontrolle auf silent mutation

Die aus der Minipräparation gewonnenen cDNAs werden auf das Vorhandensein der gewünschten silent mutation überprüft.

Bei positivem Nachweis wird eine weitere Kultur für eine Minipräparation angesetzt, um die daraus präparierte cDNA zu sequenzieren und bei Richtigkeit in den gewünschten pcDNA3.1+ umzuklonieren.

6. DNA-Maxipräparation

„Glystock“ anlegen

Von der Übernachtskultur der Maxipräparation wird ein „Glystock“ angelegt, um Animpfungsmaterial für den Fall aufzubewahren, dass mehr DNA für weitere Versuche benötigt wird.

In einem 2 ml Reaktionsgefäß werden 1 ml Übernachtskultur und 1 ml Glycerol/LB (im Verhältnis 3:2) zusammengegeben und bei -80°C gelagert.

DNA-Maxipräparation

Die Übernachtskultur wird für 15 min bei 1000 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand wird dekantiert. Für die DNA-Präparation wird das Bakterienpellet sowie der Nucleobond AX-kit (Macherey-Nagel) verwendet. Das Vorgehen erfolgt nach dem im Handbuch angegebenen Prozedere.

7. Sequenzierung der aus der DNA-Mini-bzw. Maxipräparation gewonnenen rekombinanten DNA

DNA-Sequenzierung

Bei der Sequenzierung wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger verwendet. Sie beruht auf der enzymatischen Kopierung des zu sequenzierenden DNA-Stranges mit DNA-Polymerase (hier Sequenase genannt). Die zu sequenzierende DNA muss als Einzelstrang vorliegen, an den sich am 3`-Ende ein Primer anlagert.

Für die Polymerisierung benötigt man alle 4 Desoxynukleotide, eines der 4 Desoxynukleotide muss radioaktiv markiert sein, um die Syntheseprodukte später identifizieren zu können. Weiterhin benötigt man 4 getrennte Ansätze mit je einer der 4 Basen als Didesoxynukleotid.

Wenn die Polymerase die einsträngige DNA auffüllt, werden zum einen immer auch radioaktiv markierte Desoxynukleotide eingebaut. Zum anderen kann sie, wenn sie ein Didesoxynukleotid einbaut, dort nicht weiter synthetisieren, da die nötige -OH-Gruppe zum Anknüpfen fehlt. Die Sequenz bricht an dieser Stelle ab. Da die Didesoxynukleotide zufällig eingebaut werden, entstehen während der Reaktion DNA-Fragmente von 2 bis 300 Basen.

Die 4 Ansätze werden nach der Reaktion erhitzt, um einzelsträngige DNA zu erhalten, nebeneinander auf ein Polyacrylamidgel geladen und elektrophoretisch nach ihrer Länge aufgetrennt. Die Lage der einzelnen DNA-Fragmente im Sequenzgel wird durch Autoradiographie des Gels sichtbar gemacht. Die DNA-Sequenz kann so anhand der Kenntnis, in welchem Ansatz welches Didesoxynukleotid war und dass die kürzesten Fragmente in der Gelelektrophorese am weitesten wandern, direkt vom Röntgenfilm abgelesen werden.

Sequenzierungsprotokoll

Ca. 3 µg DNA auf 20 µl Aqua dest. werden mit 2 µl Denaturierungsmix vermischt und bei 37°C für 15 min inkubiert. Dann wird die DNA mit Ethanol gefällt (s. „Ethanol-Fällung“) und das Pellet in 7 µl Aqua dest. aufgenommen.

Für die Sequenzierung wird der Sequenzierungskit von Fermentas verwendet:

Ansatz von 10 µl Volumen:

7 µl DNA in Aqua dest.

1x Sequenzierung Puffer (s. „Pufferlösungen“)

1 pmol Primer

Der Ansatz wird 2 min im Heizblock auf 65°C erhitzt und dann langsam auf 37°C abgekühlt. Dabei wird die DNA durch die Hitze einsträngig und beim Abkühlen kann sich der Primer anlagern.

Es werden 4 Reaktionsgefäße mit Termination Mix, die das jeweilige Didesoxynukleotid enthalten, auf 37°C erwärmt.

Parallel wird Folgendes zum DNA-Ansatz dazugegeben:

0,1 M Dithiothreitol (DTT)

1 x Labeling Mix (15 µM dGTP, 15 µM dCTP, 15 µM dTTP)

2,5 µCi α 33 Ph dATP

5 U Sequenase

Dieser Ansatz muss 2 min bei Raumtemperatur inkubieren. Dadurch werden schon DNA-Fragmente ohne Abbruch synthetisiert, damit auch Fragmente von bis zu 300 Basen entstehen.

Dann wird der Ansatz zu gleichen Teilen in die 4 vorbereiteten Reaktionsgefäße pipettiert. Diese inkubieren 5 min bei Raumtemperatur. Dabei werden nun auch Didesoxynukleotide eingebaut und es entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Stop-Lösung (s. „Pufferlösungen“) unterbrochen und die Ansätze bis zum Aufladen auf das Gel bei 4°C aufbewahrt.

Polyacrylamidgel

Das folgende Gel enthält:

40 ml easygel	(5,7 % Acrylamid, 0,3 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 42% Harnstoff auf TBE-Puffer)
60 µl TEMED	(N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin)
100 µl APS 10%ig	(Amoniumpersulfat)
auspolymerisieren lassen	
Laufpuffer TBE	

Polyacrylamid entsteht durch Polymerisation von Acrylamid-Monomeren, die durch z.B. N,N'-Methylenbisacrylamid quervernetzt werden. Freie Radikale aus Persulfat initiieren die Polymerisation. TEMED katalysiert die Bildung dieser Radikale aus Amoniumpersulfat und beschleunigt so die Reaktion (Ibelgaufts 1990).

Die Proben werden 2 min auf 75°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt, um einsträngige DNA zu erhalten. Sie werden auf das Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Anschliessend wird das Gel mit einer 10%igen Methanol/ 10%igen Essigsäure-Lösung fixiert auf Whatmanpapier gezogen und im Geltrockner getrocknet. Dann wird es auf einen Röntgenfilm gelegt, der über Nacht exponiert wird.

Am nächsten Tag wird der Film entwickelt und fixiert und die Sequenz kann abgelesen werden.

Ist die Sequenz korrekt, können mit dem Glukagon Rezeptor die weiteren Versuche begonnen werden. Der GLP-1-Rezeptor kann nun in seiner vollen Länge, die ja korrekt ist, in den pcDNA3.1 umklontiert werden und dann durch eine Maxipräparation die nötige Menge DNA für die weiteren Versuche gewonnen werden.

8. Umklonierung der rekombinanten DNA des GLP-1 Rezeptors der Ratte vom Vektor pTEJ-8 in den Vektor pcDNA3.1+

Der pTEJ-8-GLP-1-Rezeptor wird mit den Enzymen Hind III und BstXI geschnitten, so dass die GLP-1-Rezeptor-cDNA als Fragment vorliegt.

Zudem wird das Plasmid pcDNA3.1+ mit o.g. Enzymen geschnitten und somit geöffnet. Nach Gelaufreinigung werden Rezeptorfragment und pcDNA3.1+ ligiert.

Das Ligat wird letztlich amplifiziert und sequenziert, um das Vorhandensein der gewünschten Mutation zu bestätigen.

9. Transiente Transfektion von COS-7 Zellen mit der rekombinanten DNA und der Wildtyp-DNA

COS-Zellen

Diese Zelllinie leitet sich von der etablierten Affennieren-Zelllinie CV1 (fibroblastenartige Zelllinie der permanenten AGMK-Zellen; African green monkey kidney) ab, die durch Behandlung der Zellen mit der Mutante des Affenvirus SV40 entstanden ist; daher der Name **CV1 Origin SV40**.

Die hier verwendeten COS-7-Zellen werden in RPMI 1640 (10% fetales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin) bei 37°C, 5 % CO₂ gehalten und alle 3 Tage passagiert.

Transiente Transfektion

Es werden COS-7-Zellen auf 94 mm Petrischalen ausgesät und kultiviert, bis die Schale zu 30-50% bewachsen ist. Dann werden unter der Cleanbench 2 Ansätze vorbereitet:

- I: 10 µg Plasmid
30 µl CaCl₂ 2M
160µl 0,1 x TE
- II: 200µl 2 x HBS

Ansatz I wird unter gleichmässigem Schütteln zu Ansatz II pipettiert. Dieser Ansatz inkubiert 45 min bei Raumtemperatur. So erhält man DNA in Form von Calciumphosphat-Präzipitaten.

Während der Inkubationszeit wird bei den auf 50% bewachsenen Schalen das RPMI 1640-Medium gegen 10 ml DMEM-High Glukose-Medium ausgetauscht

Anschliessend wird der Ansatz auf die Zellen gegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert.

10. Synthese von GLP-1- und Glukagon-Analoga

Die Synthese der Analoga wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Eike Hoffmann (Boehringer Mannheim AG, Mannheim, jetzt Roche) geplant und durchgeführt.

Die Analoga wurden nach der Fest-Phasen Methode mittels eines SyRo II „multiple peptide synthesizers“ synthetisiert unter Befolgung der Fmoc/tBu Strategie.

Um amidierete Peptide zu erhalten, verwendet man ADPV als Anker-molekül auf aminomethyliertem Polystyrene-(1 %)-divinylbenzen (40 mg, 20 µmol/Peptid). Die Fmoc-geschützten Aminosäuren werden für 40 min bei 10 x Überschuss gekoppelt. Hierbei werden als aktivierende Reagenzien Diisopropylcarbodiimid (1 Äq) und 1-Hydroxybenzotriazol (1 Äq) eingesetzt. Die Deprotektion wird für 2 mal 10 min in Piperidin/ Dimethylformamid (1:1; v/v) ausgeführt. Die Spaltung wird innerhalb von 3 h in Trifluoressigsäure/ Ethandithiol/ Dimethylsulfid/ m-Cresol (85:5:5:5) durchgeführt. Die Ausbeute grober Analoga nach Abspaltung vom Trägermaterial beträgt etwa 60 %.

Die Peptide werden mittels präparativer HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) über eine Nucleosil C₁₈ Säule aufgereinigt. Der Reinheitsgrad war > 95 %.

Die Peptide werden mittels Elektrospray-Massenspektrometrie charakterisiert. Die Massenspektren werden auf einem AutoSpec T Massenspektrometer aufgezeichnet, das mit einem Elektrospray-interface ausgerüstet ist. Innerhalb der Limitierung der Methode waren die Massen der Peptide mit den errechneten Massen identisch.

11. Radioaktive Markierung von GLP-1 und den GLP-1-/Glukagon-Analoga

Die radioaktive Markierung der Peptide wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Gerard McGregor, Ph.D. (Institut für Normale und Pathologische Physiologie, Philipps-Universität Marburg) nach der von Göke und Conlon (Göke und Conlon 1988a) beschriebenen Iodogenmethode durchgeführt.

Hierbei oxidiert Iodogen (1, 3, 4, 6-Tetrachloro-3 α , 6 α -diphenylglucoluril)Na¹²⁵I, wodurch ¹²⁵I in der Lage ist, an aromatische Ringe des Peptids zu binden; bei GLP-1 und Glukagon insbesondere an Tyrosin.

Iodogen (1 mg) wird in 1 ml Dichlormethan gelöst und 20 µl dieser Lösung werden in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Mit Hilfe von Stickstoff wird das Lösungsmittel

evaporiert, so dass die Wand des Reaktionsgefäßes mit einer feinen Iodogenschicht beschichtet ist. 10 µg des zu markierenden Peptids, gelöst in 90 µl Natriumphosphat 0,2 M pH 7,5, werden in das iodogenhaltige Gefäß gegeben. Die Markierung wird durch Zugabe von 300 µl Trifluoressigsäure (TFA) 0,1 % gestoppt.

Die Abtrennung des ¹²⁵I-markierten Peptids erfolgt durch HPLC. Dazu wird die Lösung mit einer Kunststoffspritze auf eine mit Acetonitril 70 % aktivierte und mit TFA 0,1 % equilibrierte Nova-Pak-C₁₈ Säule gegeben. Die Säule wird dann für 5 min mit TFA 0,1 % bei einer Flussrate von 1,5 ml/min gespült. Anschliessend erfolgt die Herauslösung des Peptids mit angesäuertem Acetonitril (Acetonitril 70 %/ TFA 0,1 %), das in kontinuierlich ansteigender Konzentration von 0 bis 70 % über 80 min auf die Säule gegeben wird. Minütlich wird 1,5 ml des Produkts gesammelt, dessen Radioaktivität mit Hilfe eines Szintillationszählers für Gammastrahlen gemessen wird. Den Proben, die den Peak an radioaktiv markiertem Peptid enthalten, wird 0,1 % BSA und mit HCl angesäuertes Ethanol zugegeben.

Die Peptide werden bei -20°C gelagert.

12. Bindungsstudien mit den transient transfizierten COS-7 Zellen

Verdünnung der markierten und nicht-markierten Peptide

Die markierten Peptide (Tracer) werden jeweils vor dem Versuch so mit KRB-Puffer verdünnt, dass in 20 µl dieser Lösung ca. 20000 Gammaimpulse pro Minute (cpm) zu messen sind.

Die nicht markierten Peptide, die vorher bereits aliquotiert worden sind (10 µl á 1 µg/µl), werden so verdünnt, dass dabei eine 10⁻⁵ molare Peptid-Lösung entsteht. Aus dieser Lösung wird eine Verdünnungsreihe mit Zehnerpotenzschritten angesetzt bis zur Verdünnung 10⁻¹⁰M.

Mit dieser Verdünnungsreihe kann man anschliessend den Versuch für die Konzentrationen kalten Peptids von 10⁻⁶M bis 10⁻¹¹M, bzw. 0M (nur KRB), durchführen, da bei der Versuchsdurchführung die Ansätze der Verdünnungsreihe durch die Zugabe der übrigen Reaktionspartner nochmals um eine Zehnerpotenz verdünnt wird.

Die bei einer GLP-1 Konzentration von 10⁻⁶ M noch messbare Tracerbindung wird als unspezifische Bindung definiert.

Bindungsprotokoll

Nach dem Ablösen der Zellen von den Kulturplatten mit PBS-EDTA und Zentrifugation bei 1000g für 5 min wird der Überstand dekantiert und die Zellen werden in KRB (versetzt mit 0,1 % Bacitracin, 1% BSA) aufgenommen. Nun werden in Reaktionsgefässen je 30 µl der Verdünnungsreihe des Peptides vorgelegt und in ein weiteres Reaktionsgefäss 30 µl KRB pipettiert. Dazu werden je 250 µl Zellsuspension und 20 µl Tracer gegeben und 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bei dieser Reaktion konkurrieren das kalte und das heiße Peptid miteinander um die Bindung am Rezeptor. Anschliessend werden die Zellen für 4 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird im Gammacounter gemessen.

Die Peptidbindung wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Peptidbindung} = \frac{(B_{\max} - B_{\text{unspez}}) \times 100}{(R_{\text{ges}})}$$

B_{\max} : Bindung bei Abwesenheit von nicht markiertem Peptid

B_{unspez} : Messung in Gegenwart von 10^{-6} M nicht markierten Peptids

R_{ges} : gesamte eingesetzte Radioaktivität

Die Bindung der einzelnen Verdünnungsstufen (B_X) ist die jeweilig gemessene Radioaktivität in counts per minute abzüglich des Wertes der unspezifische Bindung.

Die relative Bindung wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{relative Bindung} = \frac{B_X \times 100}{B_{\max}}$$

13. cAMP Assay

Zu 250µl Zellsuspension werden zur Hemmung des cAMP Abbaus 25 µl 10mM IBMX gegeben. Es folgt die Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur. Anschliessend Zugabe von 30 µl Puffer (Kontrolle) oder Peptidlösung

(Endkonzentration 10^{-8} - 10^{-13} M); weitere Inkubation für 30 min. Die Reaktion wird durch Zugabe von 200 μ l eiskalter TCA 7,5% gestoppt. Die Proben werden auf Eis gestellt und das Reagenz wird sonifiziert. Dabei werden die Zellen zerstört und das zytosolische cAMP freigesetzt. Nach Zentrifugation bei 16000 g für 5 min werden 200 μ l des Überstands in neue Reagenzgläser pipettiert, in die bereits 50 μ l HCl 0,1 M vorgelegt wurde. Die HCl dient der Ansäuerung der Proben, um die TCA etherlöslich zu machen. Die Proben werden zur Entfernung der Säure 2 x mit 1ml Diethylether gewaschen und dann bei -20°C gelagert.

Die Messung des cAMP wird mit Hilfe eines RIA-kits der Fa. Immunotech, Hamburg, durchgeführt. Bei diesem Kit sind die Reagenzgläser mit Anti-cAMP-Antikörpern beschichtet.

Die Durchführung des Kits erfolgt nach den Herstellerangaben.

14. Gesamt-DNA Bestimmung

Um die Bindungsdaten von verschiedenen Zellplatten vergleichen zu können, muss man die Menge der DNA der einzelnen Proben bestimmen, da möglicherweise, trotz grosser Sorgfalt bei der Aussaat, nicht auf allen Platten gleich viele Zellen gewachsen sind. Bindungsdaten und cAMP-Messungen können so auf den DNA-Gehalt der Proben und somit indirekt auf die Zellzahl bezogen werden.

Man gibt zu 250 μ l Zellsuspension 750 μ l eiskalte PCA 0,5M. Dieser Ansatz inkubiert 1 h im Eisbad und wird dann bei 2500 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet 2 x mit eiskalter PCA gewaschen. Dann wird nochmals 500 μ l PCA hinzugegeben und 20 min im 75°C -Wasserbad inkubiert. Nachdem der Ansatz abgekühlt ist, wird er nochmals für 5 min bei 2500 g zentrifugiert. 500 μ l des Überstandes werden in eine Mikroküvette pipettiert und 500 μ l Farbreagenz zugegeben. Dann wird der DNA-Standard so mit PCA verdünnt, dass sich eine Verdünnungsreihe von 0 μ g, 3 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 15 μ g und 20 μ g DNA in je 500 μ l ergibt. Auch zu diesen doppelt angesetzten Standards werden je 500 μ l Farbreagenz pipettiert.

Die Ansätze inkubieren für 16-20 h im Dunkeln bei Raumtemperatur. Dann werden sie bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen.

Aus den Extinktionen der Standards kann ein Bezugskurvenwert (BZK) errechnet werden, der dann zum Berechnen der Konzentration jeder Probe verwendet wird. Dazu

wird für jeden Standard 1-n der Wert X berechnet. Der Mittelwert von diesen Werten X_{1-n} ist der BZK:

$$X_{1-n} = \frac{c_{ST1-n}}{E_{ST1-n}} \quad \text{BZK} = X_{1-n}$$

Die Konzentration der Probe berechnet sich wie folgt:

$$c_p = \text{BZK} \times E_p$$

mit:

c_p = Konzentration der DNA in der Probe

E_p = Extinktion der Probe

c_{ST} = Konzentration der DNA im Standard

E_{ST} = Extinktion des Standards

15. Umklonieren der DNA vom GLP-1-Rezeptor wild/mut, Glukagon-Rezeptor wild/mut in den Vektor pcDNA3.1/V5-His B

pcDNA3.1/V5-His B

Dieser Vektor stammt von dem Plasmid pcDNA3.1+ ab, hat aber im Anschluss an seine multiple cloning site eine Sequenz, die für ein V5 Epitop kodiert. „In frame cloning“ in diesen Vektor garantiert, dass an die gewünschte cDNA ein V5 Epitop am 3'Ende angefügt wird.

Die Klonierung erfolgt wie oben beschrieben mit identischen Schnittstellen.

16. Membran Präparation für den Western-blot mit Proteinbestimmung nach Bradford

Plasma Membran Präparation

Die Zellen werden mit PBS-EDTA von den Schalen abgelöst und für 10 min bei 1000 g zentrifugiert; der Überstand wird dekantiert und die Zellen werden in Homogenisationspuffer aufgenommen. Dann werden die Zellen im Glas-Glas Potter und durch anschliessendes Sonifizieren (30 sec) zerstört. Jetzt werden in 2 Ultrazentrifugationsröhrchen je 4 ml 41 %ige Saccharose Lösung pipettiert und auf Eis gestellt. Darauf werden die Zellen geschichtet und 1 h bei 100000 g und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Danach wird die Zwischenbande gewonnen. Diese weisse Bande stellt die Membranen dar. Sie wird in ein neues Ultrazentrifugationsröhrchen pipettiert, mit Homogenisationspuffer aufgefüllt und nochmals 30 min bei 100000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet wird nur in dem restlichen zurücklaufenden Überstand aufgenommen, um eine möglichst hohe Konzentration zu erhalten. Die präparierten Membranen werden aliquotiert (z.B. 4 x 20 µl). Der Rest der Membranen wird für die Proteinbestimmung benötigt. Die Aliquots werden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Proteinbestimmung nach Bradford

In Halbmikroküvetten werden je 500 µl Bio Rad Farbreagenz vorgelegt. In die Küvetten für die Proben werden je 5 µl der Membranpräparation pipettiert. In die Küvetten der Standards werden aus dem BSA-Standard (1 mg/ml) in Doppelbestimmung 2-, 4-, 8-, 12-, 16- und 32 µg pipettiert. Jetzt werden zu allen Küvetten nochmals 500 µl Bio Rad Farbreagenz zugegeben und für 15 min inkubiert. Anschliessend werden die Lösungen bei 595 nm photometrisch gemessen. Berechnung der Konzentration der Proben s.o.

17. Western-Blot

Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei diesem Gel wird Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet, da es von Polypeptiden in einem konstanten Gewichtsverhältnis gebunden wird. Dies führt annähernd zum Ausgleich von Ladungsdifferenzen zwischen unterschiedlichen Proteinen, da pro gebundenem SDS-Molekül jeweils zwei negative Ladungen zur Gesamtladung beigetragen werden. Mit SDS komplexierte Proteine wandern daher bei der Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichtes.

Das Gel besteht aus einem 6 %igen Polyacrylamid-Sammelgel und einem 12 %igen Polyacrylamid-Trenngel. Das Sammelgel dient dazu, dass die Proteine in einer einheitlichen Front gesammelt in das Trenngel einlaufen, in dem die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden.

Gelprotokoll

Sammelgel:

Sammelgelpuffer	2,5 ml
Aqua dest.	5,9 ml
Acrylamidsg. (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	1,6 ml
10 % APS	60 µl
TEMED	20 µl

Trenngel:

Trenngelpuffer	2,0 ml
Aqua dest.	2,8 ml
Acrylamidsg. (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	3,2 ml
10 % APS	25 µl
TEMED	12,5 µl

Zuerst wird das Trenngel gegossen und sofort mit 0,1 % SDS überschichtet, damit eine gerade Oberfläche entsteht. Nachdem es nach ca. 45 min auspolymerisiert ist, wird das SDS abgekippt und das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und polymerisiert für 45 min.

Aufarbeitung der Membranproben

Die Proben werden mit 4 x Probenpuffer auf die gewünschte Proteinkonzentration verdünnt und mit 1 % DTT versetzt. Dieser Ansatz inkubiert für 20 min bei Raumtemperatur.

Anschliessend werden die Proben auf das vorbereitete Gel geladen. Sie laufen die ersten 30 min bei 100 V in das Sammelgel ein und werden dann bei 150 V im Trenngel aufgetrennt.

Transfer auf Nitrocellulosemembran

Der Aufbau des Transfers erfolgt in einer mit Transfer-Puffer gefüllten Schale vom negativen zum positiven Pol in folgender Reihenfolge:

Schwamm

2 x Whatmanpapier

Gel

Nitrocellulosemembran

2 x Whatmanpapier

Schwamm

Der Transfer wird bei 300 mA für 1,5 h durchgeführt. Die Kammer muss dabei mit einem Eispaket gekühlt werden.

Immunreaktion

Die Nitrocellulosemembranen werden 3 h mit 5 %iger Magermilchpulverlösung (in TBS) geblockt. Dadurch werden unspezifische Bindungsstellen geblockt, so dass bei

Zugabe des Antikörpers eine spezifische Reaktion sichtbar wird. Anschliessend wird der HRP-gekoppelte Antikörper dazugegeben (Verdünnung 1:2000). Diese Lösung inkubiert über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wird die Membran 2 x in 0,3 % Tween 20 (in TBS) und 2 x in TBS jeweils für 5 min gewaschen.

Da der Antikörper Meerrettichperoxidase-gekoppelt (Horseradish Peroxidase, HRP) ist, kann man die Protein-Antikörper-Komplexe durch eine Chemilumineszenzreaktion auf einem Film sichtbar machen. Bei dieser Reaktion oxidiert HRP mit Hilfe von Wasserstoffperoxid Luminol in alkalischem Milieu, wobei Licht emittiert wird. Mit diesem Licht kann man einen Film belichten, so dass Banden sichtbar werden, die die Lokalisation der Protein-Antikörper-Komplexe angeben. Um diese Reaktion auszulösen, werden die ECL Lösungen 1 und 2 (Amersham-Buchler, Braunschweig) im Verhältnis 1:1 gemischt und die Nitrocellulosemembran darin 1 min inkubiert. Danach wird die Membran in eine Folie eingeschlagen und auf einen Film für 10 sec, 1 min und bis zu 1 h aufgelegt.

Ergebnisse

Zur Untersuchung der Hypothesen wurden Chimäre von GLP-1 und Glukagon und deren Rezeptoren hergestellt. Bei den Peptiden wurde die Glutaminsäure an Position 9 (E9) des GLP-1 mit dem Glutamin an Position 3 (Q3) des Glukagon ausgetauscht, so dass die Chimäre [Q9]-GLP-1 und [E3]-Glukagon entstanden (Abb.6).

GLP-1	HA E GTFTSDVSSYLEG Q AAKEFIAWLKGRamid
	↓
Glukagon	HS Q GTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

Abb.6: Aminosäuresequenz von GLP-1 und Glukagon. Die ausgetauschten Aminosäuren sind fett hervorgehoben

Bei den Rezeptoren wurde das Lysin an Position 197 (K197) des GLP-1 Rezeptors mit dem Isoleucin an Position 195 (I195) des Glukagon Rezeptors ausgetauscht, so dass die Chimäre [I197]-GLP-1 Rezeptor und [K195]-Glukagon Rezeptor entstanden (Abb. 7 und 8).

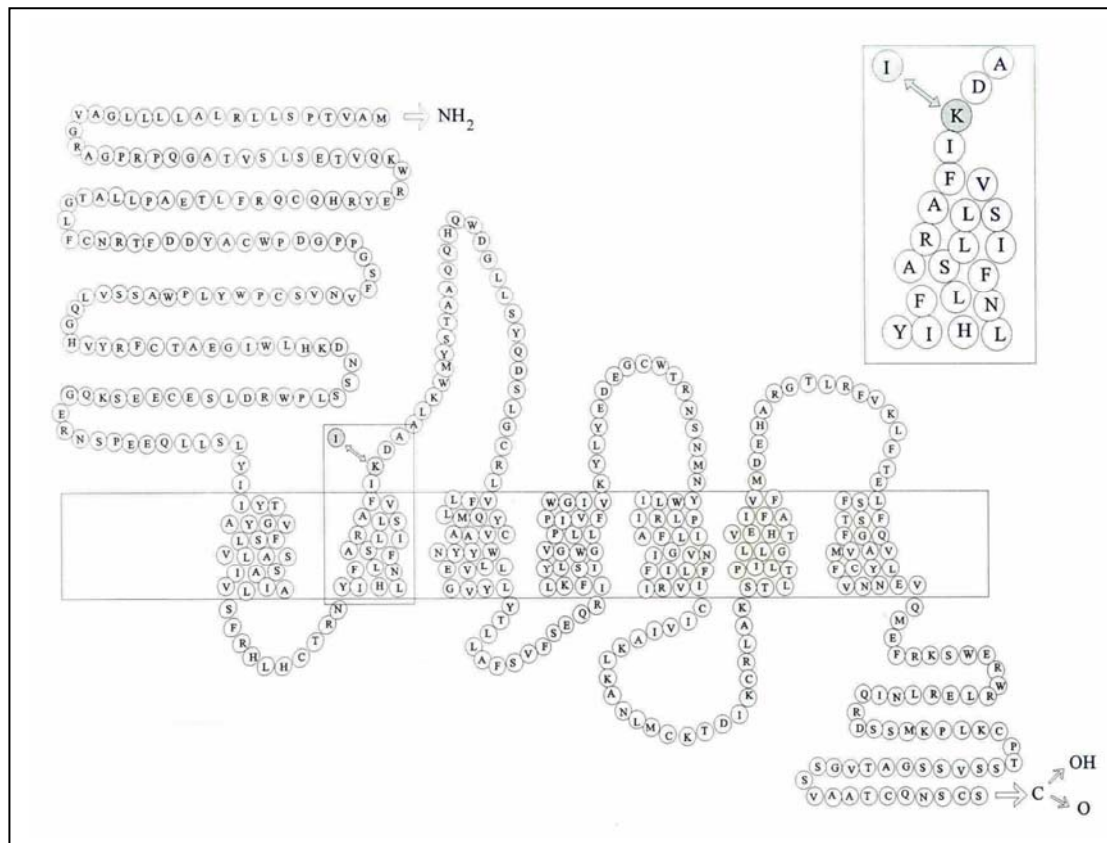


Abb.7: GLP-1 Rezeptor der Ratte mit der durchgeführten Punktmutation am K197

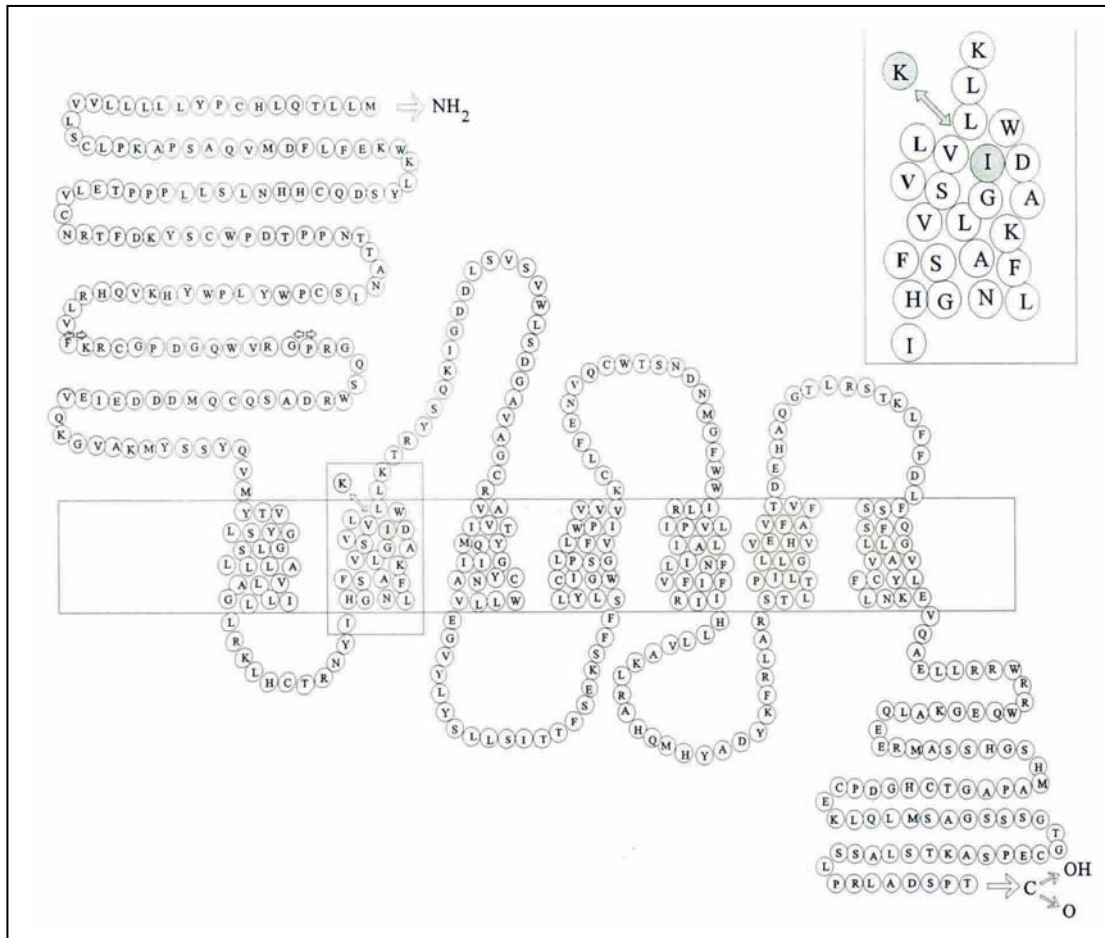


Abb.8: Glukagon Rezeptor der Ratte mit der durchgeführten Punktmutation am I195

Es wurde die Bindungsaffinität jedes der vier Peptide mit jedem der vier Rezeptoren untersucht. Dazu wurden zunächst COS7 Zellen jeweils mit der cDNA des GLP-1 Rezeptors, des [I197]-GLP-1 Rezeptor, des Glukagon Rezeptors und des [K195]-Glukagon Rezeptor transfiziert. Um die Bindungsaffinität der vier verschiedenen Peptide mit dem jeweiligen Rezeptor zu testen, wurden die transfizierten Zellen 24 Stunden nach Transfektionsbeginn mit radioaktivem Peptid in Abwesenheit und in Anwesenheit des entsprechenden Peptids in ansteigender Konzentration für 30 min. bei 37° C inkubiert. Um z.B. die Bindungsaffinität des [Q9]-GLP-1 zum GLP-1 Rezeptor zu untersuchen, wurden COS7 Zellen mit der cDNA des GLP-1 Rezeptors transfiziert und nach 24 Stunden mit radioaktivem [Q9]-GLP-1 in Abwesenheit von [Q9]-GLP-1 und in Anwesenheit von [Q9]-GLP-1 in ansteigender Konzentration für 30 min. bei 37° inkubiert. Dies konnte für 12 der 16 möglichen Kombinationen durchgeführt werden. Die Bindung zwischen [E3]-Glukagon und den 4 verschiedenen Rezeptoren konnte nicht untersucht werden, da bei der Markierung mit radioaktivem Iodogen das Peptid wiederholt zerbrach.

Wie aus Abbildung 9 ersichtlich waren die Peptide unterschiedlich in der Lage, radioaktiv markiertes Peptid aus der Bindung an den einzelnen Rezeptoren zu verdrängen. Eine hohe Bindungsaffinität konnte für die Kombinationen GLP-1/GLP-1R (K_d von $0,6 \pm 0,006$ nM), Glukagon/GlukagonR (K_d von $17 \pm 0,04$ nM) und [Q9]-GLP-1/GLP-1R (K_d von $1,14 \pm 0,05$ nM) nachgewiesen werden. Für alle anderen Kombinationen konnte keine spezifische Bindung nachgewiesen werden (Tab.1).

\Peptid \ Rezeptor	GLP-1	[Q9]GLP-1	Glukagon	[E3]Gukagon
GLP-1 Rezeptor	$0,6 \pm 0,006$	$1,4 \pm 0,05$	-	n.e.
[I197]- GLP-1 Rezeptor	-	-	-	n.e.
Glukagon Rezeptor	-	-	$17 \pm 0,04$	n.e.
[K195]- Glukagon Rezeptor	-	-	-	n.e.

K_d in nM

Tab.1: Bindungsaffinität des jeweiligen Peptids mit dem jeweiligen Rezeptor. K_d : Dissoziationskonstante im Mittel \pm SD mit $n=4$; -: keine Bindung messbar; n.e.: nicht erhoben

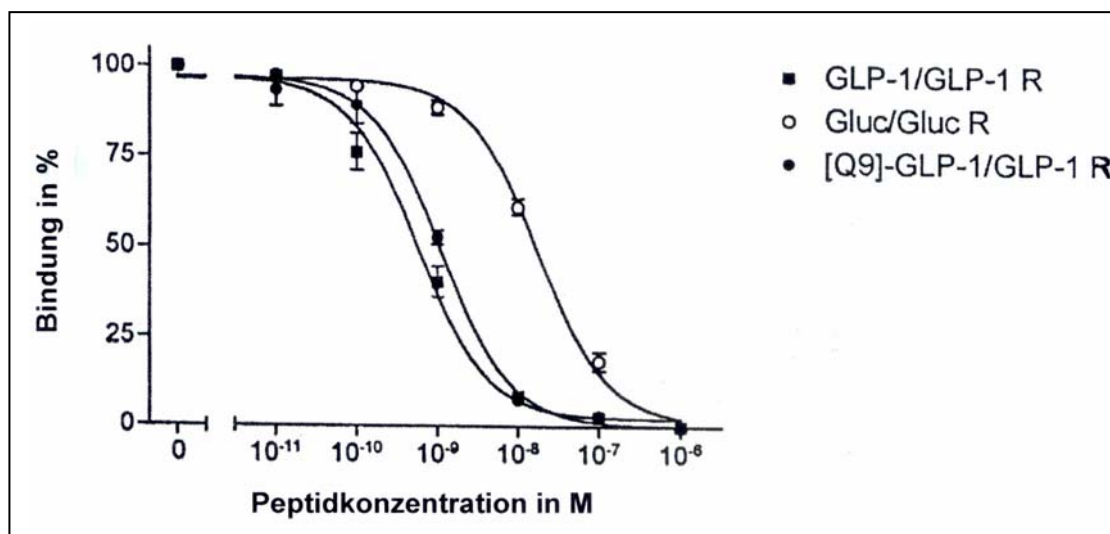


Abb.9: Bindungsaffinität von GLP-1 zum GLP-1 Rezeptor, Glukagon zum Glukagon Rezeptor und [Q3]-GLP-1 zum GLP-1 Rezeptor

Da der fehlende Nachweis von Bindung auch dadurch bedingt sein kann, dass der entsprechende Rezeptor nicht von der COS7 Zelle exprimiert wird, wurde für jeden der vier Rezeptoren ein Western-blot durchgeführt, mit dem man die Anwesenheit der Rezeptorproteine in der Zellmembran beweisen kann. Dabei konnten bei COS7 Zellen, die mit cDNA vom GLP-1 Rezeptor und vom [I197]-GLP-1 Rezeptor transfiziert waren, zwei gleichintensive Banden von 63kDa, entsprechend dem Molekulargewicht des GLP-1 Rezeptors (Göke,-R et al. 1989a, 1992), nachgewiesen werden. Bei COS7 Zellen transfiziert mit cDNA vom Glukagon Rezeptor und vom [K195]-Glukagon Rezeptor wurden zwei gleichintensive Banden von 63-77 kDa nachgewiesen. Die Breite dieser Banden ist durch die Glykosylierung des Rezeptors zu erklären. Carruthers et al. (Carruthers et al. 1994) kamen in ihren Untersuchungen zu den gleichen Ergebnissen. Diese sind konform mit dem angenommenen Molekulargewicht des Rezeptors von etwa 62kD (Iyengar et al. 1984, Iwanij et al. 1985, Jelinek et al. 1993). Bei den jeweiligen Kontrollen, bei denen COS7 Zellen nur mit der cDNA des Vektors transfiziert wurden, war kein Protein nachweisbar (Abb.10).

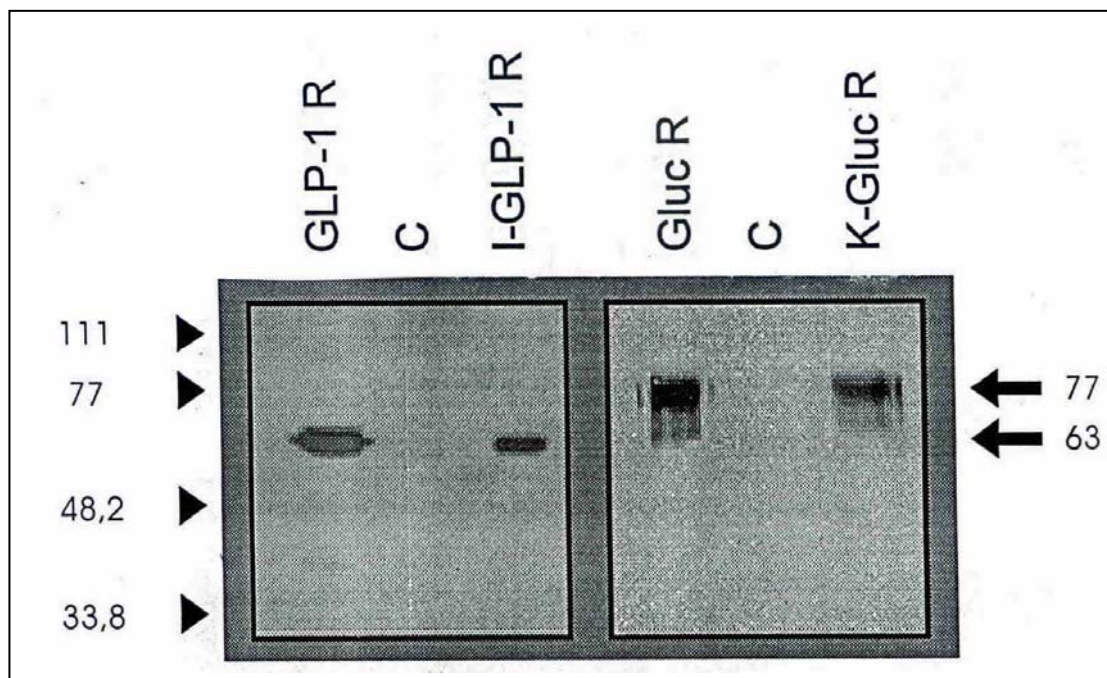


Abb.10: Westernblot. COS 7 Zellen transfiziert mit GLP-1 Rezeptor (GLP-1R), [I197]-GLP-1 Rezeptor (I-GLP-1R), Glukagon Rezeptor (GlucR), [K195]-Glukagon (K-GlucR) und als Kontrolle (C) nur mit Vektor cDNA.

Um andererseits ausschliessen zu können, dass COS7 Zellen von sich aus bereits den GLP-1 Rezeptor oder den Glukagon Rezeptor exprimieren, wurden Bindungsassays

mit ihrem korrespondierenden Peptid durchgeführt. Es konnte keine Bindung nachgewiesen werden.

Der GLP-1 Rezeptor und der Glukagon Rezeptor gehören beide zur Gruppe der G-Protein-bindenden Rezeptoren der Klasse B, die über ein G-Protein die Adenylatzyklase aktivieren. Diese produziert cAMP aus ATP. cAMP ist ein intrazellulärer Botenstoff, der zur Aktivierung verschiedener Zellaktivitäten beiträgt. Die Interaktion zwischen Peptid und einem solchen G-Protein-bindenden Rezeptor führt so über die Aktivierung der Adenylatzyklase zur cAMP-Produktion und über diese zur Zellaktivierung. Somit ist der Nachweis von cAMP in der Zelle ein Zeichen der erfolgreichen Interaktion von Peptid und Rezeptor.

Zur Untersuchung der Peptid/Rezeptor Interaktion wurden cAMP Assays in allen 16 möglichen Kombinationen durchgeführt. Dazu wurden zunächst COS7 Zellen jeweils mit der cDNA des GLP-1 Rezeptors, des [I197]-GLP-1 Rezeptors, des Glukagon Rezeptors und des [K195]-Glukagon Rezeptors transfiziert. Nach 24 Stunden wurden diese dann mit Peptid in aufsteigender Konzentration 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen zerstört und die Zelltrümmer von der zu untersuchenden Lösung getrennt. Zur Untersuchung dieser Lösung wurde ein Radioimmunoassay verwendet, der radioaktiv markierte, cAMP spezifische Antikörper verwendet. So konnte die cAMP-Produktion bestimmt werden, die die unterschiedlichen Peptid-Konzentrationen bewirkt hatten.

Bei der Untersuchung der cAMP-Produktion unterschieden sich die Ergebnisse von den Bindungsversuchen, zumal hier technisch alle Kombinationen möglich waren, also auch die Wirkung von [E3]-Glukagon auf die vier Rezeptoren untersucht werden konnte (Abb.11).

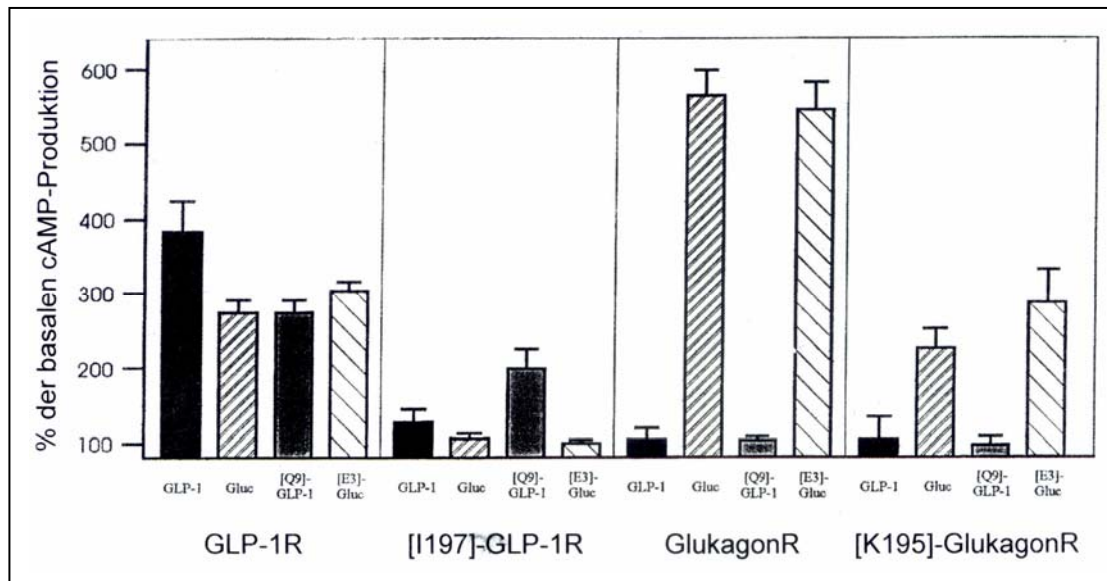


Abb.11: cAMP-Produktion der mit dem jeweiligen Rezeptor transfizierten COS7 Zellen bei einer Peptidkonzentration des jeweiligen Peptids von 10^{-8} M

Bei den Versuchen mit dem GLP-1 Rezeptor wurde bei einer Peptidkonzentration von 10^{-8} M eine signifikante cAMP-Produktion für alle vier Peptide nachgewiesen. Für [Q9]-GLP-1, Glukagon und [E3]-Glukagon war sie etwa gleichgross, aber geringer als die cAMP-Produktion durch GLP-1. Andererseits unterschieden sich die Werte der EC_{50} (50% effektive Konzentration) der drei Peptide: $7,15 \times 10^{-11}$ M für [Q9]-GLP-1, $5,9 \times 10^{-12}$ M für Glukagon und $1,6 \times 10^{-13}$ M für [E3]-Glukagon (Abb.12).

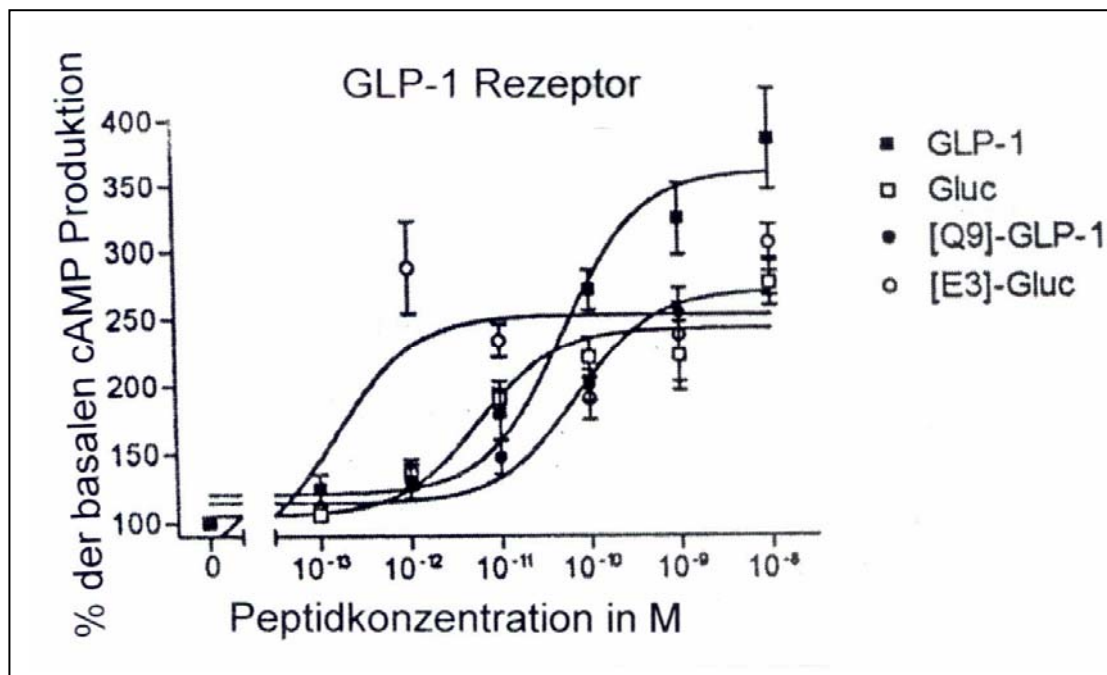


Abb.12: cAMP-Produktion der mit GLP-1 Rezeptor transfizierten COS7 Zellen bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen

Bei den Versuchen mit dem [I197]-GLP-1 Rezeptor konnte für [Q9]-GLP-1 eine geringe und für GLP-1 eine minimale cAMP-Produktion nachgewiesen werden (Abb.11), zu klein, um daraus sinnvolle EC_{50} -Werte zu berechnen.

Bei den Versuchen mit dem Glukagon Rezeptor zeigte sich bei Glukagon und [E3]-Glukagon eine gleichgrosse cAMP-Produktion bei einer Peptidkonzentration von 10^{-8} M. Sie hatten eine EC_{50} von $1,6 \times 10^{-10}$ M für Glukagon und $1,8 \times 10^{-9}$ M für [E3]-Glukagon (Abb.13), somit eine leicht geringere cAMP-Produktion bei [E3]-Glukagon bei geringeren Peptidkonzentrationen, die sich aber bei maximaler Peptidkonzentration an die von Glukagon angleicht.

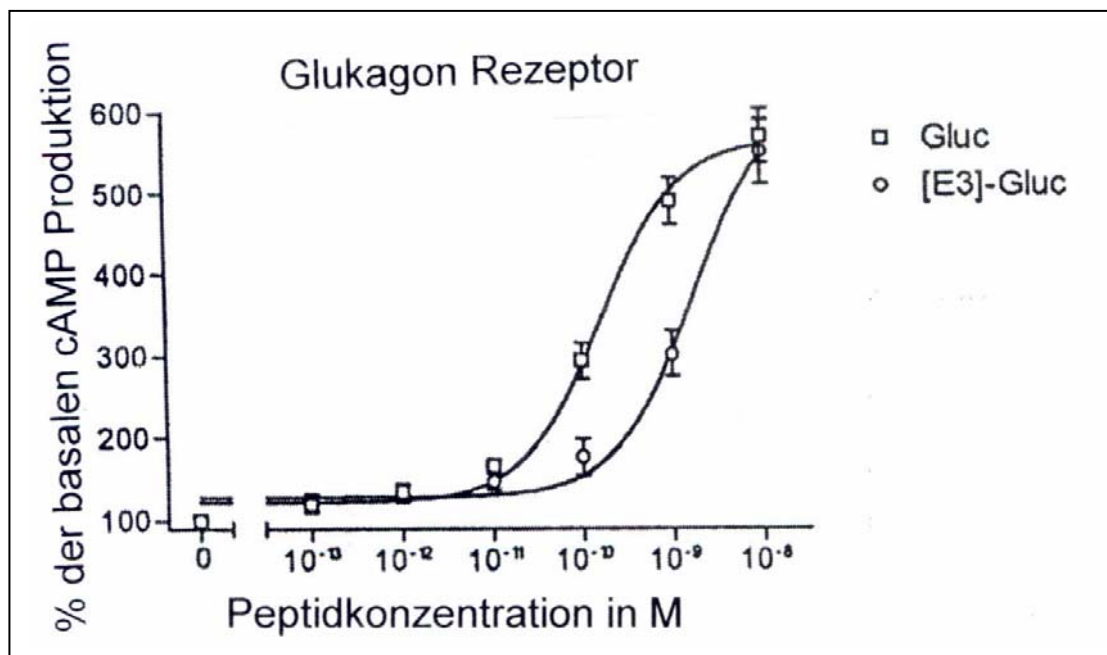


Abb.13: cAMP-Produktion der mit Glukagon Rezeptor transfizierten COS7 Zellen bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen

Bei den Versuchen mit dem [K195]-Glukagon Rezeptor wurde sowohl durch Glukagon also auch durch [E3]-Glukagon die cAMP-Produktion stimuliert; durch [E3]-Glukagon etwas stärker als durch Glukagon. Die EC_{50} -Werte betragen $1,8 \times 10^{-10}$ M für Glukagon und 2×10^{-9} M für [E3]-Glukagon (Abb.14).

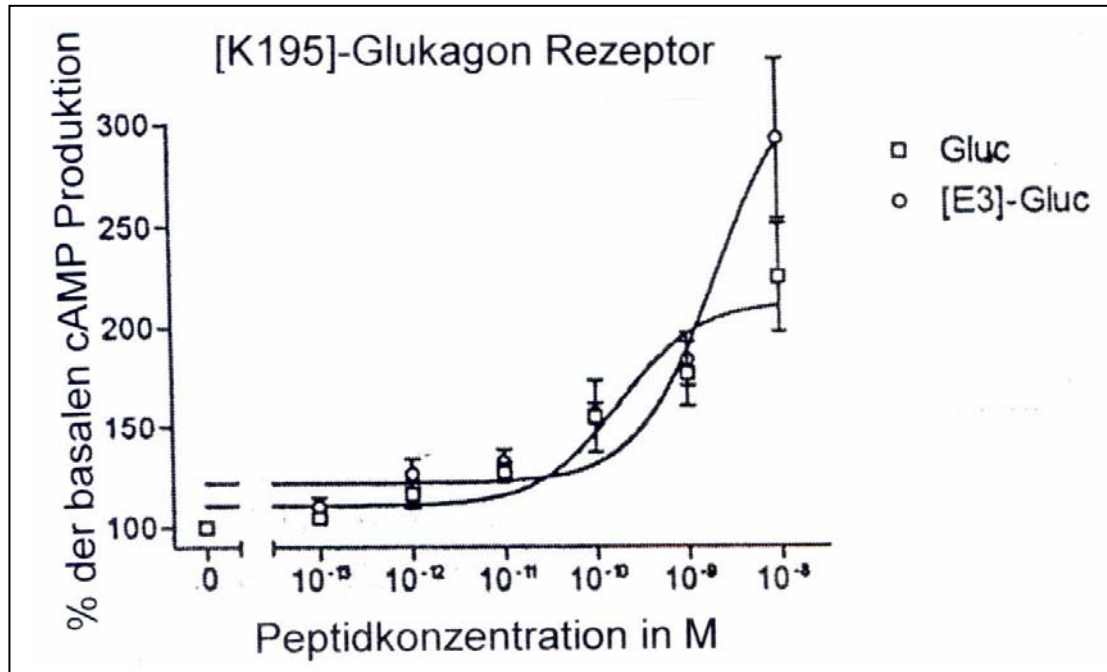


Abb.14: cAMP-Produktion der mit [K195]-Glukagon Rezeptor transfizierten COS7 Zellen bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen

Diskussion

Um GLP-1 mit seinem grossen therapeutischen Potenzial in der Behandlung des Diabetes mellitus effektiv einsetzen zu können, muss man die Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen GLP-1 und dem GLP-1 Rezeptor verstehen. Die Erkenntnisse zur Struktur-Wirkungsbeziehung der Klasse B GPCR und die darauf basierenden hier durchgeführten Versuche am GLP-1 Rezeptor und Glukagon Rezeptor können dazu beitragen, GLP-1 als Therapeutikum besser nutzbar zu machen. Der GLP-1 Rezeptor gehört zur grossen Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen und bei diesen zur Untergruppe der Klasse B, den Sekretin-ähnlichen Rezeptoren. Zu dieser Gruppe gehören auch der Glukagon Rezeptor, der GIP Rezeptor, der GRF Rezeptor, der VIP Rezeptor und andere. Diesen Rezeptoren ist neben den sieben transmembranären Domänen folgendes gemeinsam: eine lange N-terminale extrazelluläre Domäne von 120-180 Aminosäuren mit sechs stark konservierten Cysteinen, das Fehlen der Aminosäuresequenz Asp-Arg-Tyr oder Glu-Arg-Trp im N-terminalen Teil der zweiten intrazellulären Schleife (stark konserviert in Klasse A der GPCR) und eine spezifische Verteilung von Prolinen und spezifisch konservierte Aminosäuren in den transmembranären Domänen (Segre et al. 1993, Vilardaga et al. 2001).

Im Gegensatz zu den Versuchen von Turner et al. (Turner et al. 1996), die einen kompletten Selektivitätsverlust von Parathormon Rezeptor und Sekretin Rezeptor nachwiesen, bewirkte der in dieser Arbeit durchgeführte Austausch der entsprechenden nicht konservierten Aminosäuren beim GLP-1 Rezeptor und Glukagon Rezeptor keinen Verlust der Selektivität. Der [I197]-GLP-1 Rezeptor wurde nicht durch Glukagon aktiviert und GLP-1 war nicht in der Lage, den [K195]-Glukagon Rezeptor zu aktivieren. Obwohl Graziano et al. an GLP-1 Rezeptor/Glukagon Rezeptor Chimären zeigten, dass Position 29-32 des N-Terminus des GLP-1 Rezeptors essentiell für die Selektivität zwischen GLP-1 und Glukagon ist (Graziano et al. 1996), ist der Austausch alleinig des Lysins 197 vom GLP-1 Rezeptor mit dem Isoleucin 195 vom Glukagon Rezeptor nicht ausreichend, um einen Selektivitätsverlust zu bewirken.

Bei den hier vorliegenden Versuchen aber verlor der [I197]-GLP-1 Rezeptor im Vergleich zum GLP-1 Rezeptor auch die Fähigkeit, GLP-1 und die Chimäre [Q9]-GLP-1 zu binden. Und auch wenn keine Bindung zwischen diesen zwei Peptiden und dem [I197]-GLP-1 Rezeptor nachweisbar war, so bewirkte die Interaktion dieser zwei

Liganden mit dem Rezeptor doch eine geringe, wenn auch stark abgeschwächte Ausschüttung von cAMP in der Zelle. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Lysin an Position 197 des GLP-1 Rezeptors mit seiner Ladung essentiell für Bindung und Zellaktivierung durch GLP-1 ist, und untermauern die Versuche von Xiao et al. (Xiao et al. 2000), die das Lysin an Position 197 gegen Alanin ausgetauscht haben. Dieser Austausch bewirkte einen Verlust von Bindung und cAMP-Produktion um jeweils 75% im Vergleich zum Wildtyp.

Diese Ergebnisse zeigen aber auch, dass die Signaltransduktion ein sehr komplexer Prozess ist und eine Bindung, wie sie hier nachgewiesen wird, möglicherweise keine notwendige Bedingung für die Weitergabe eines Signals in die Zelle ist. Denn bei den hier vorliegenden Versuchen konnten für die Kombinationen Glukagon/GLP-1 Rezeptor und Glukagon/[K195]-Glukagon Rezeptor bei physiologischen Konzentrationen keine Bindung nachgewiesen werden, obwohl ein Anstieg von cAMP in der Zelle zu messen war. Dass eine messbare Bindung für die Zellaktivierung möglicherweise nicht notwendig ist, wird auch bei den Untersuchungen von Gelling et al. deutlich. Sie tauschten die N-terminale Domäne des GLP-1 Rezeptors mit der entsprechenden Aminosäuresequenz des GIP Rezeptors aus, was einen kompletten Bindungsverlust von GLP-1 an diesem Rezeptor bewirkte. Trotzdem wurde die Zelle durch GLP-1 aktiviert und es konnte eine cAMP-Produktion nachgewiesen werden (Gelling et al. 1997). Buggy et al. (Buggy et al. 1995) dagegen konstruierten eine Glukagon/GLP-1 Rezeptor Chimäre, die basierend auf dem Glukagon Rezeptor von Aminosäure 143 bis Aminosäure 201 die Sequenz des GLP-1 Rezeptors enthält, also ein Rezeptor mit viel grösserem „GLP-1 Rezeptor Charakter“ als der [K195]-Glukagon Rezeptor. Trotzdem hat die Arbeitsgruppe zwischen dieser Chimäre und Glukagon eine dem Glukagon/Glukagon-Rezeptor ähnlich starke Bindung festgestellt, im Gegensatz zu den Untersuchungen in dieser Arbeit, bei denen Glukagon nicht an den [K195]-Glukagon Rezeptor gebunden hat.

Bisher wurde besonders die N-terminale Domäne detailliert auf ihren Stellenwert bezüglich der Bindung zwischen GLP-1 und seinem Rezeptor untersucht, da diese für die Bindung scheinbar wichtiger ist als der C-Terminus (Gallwitz et al. 1996). Dabei konnte nicht nur gezeigt werden, dass der N-Terminus direkt an der Bindung zu GLP-1 beteiligt ist (Wilmen et al. 1996), sondern sogar einzelne Aminosäuren wie fünf von sechs Tryptophanen in diesem Bereich essentiell für die Bindung sind (van Eyll et al. 1996, Wilmen et al. 1997).

Beim Glukagon Rezeptor bewirkten Antikörper gegen die Aminosäuresequenz 126-137 an der N-terminalen Domäne und 206-219 in der ersten extrazellulären Schleife eine herabgesetzte Bindungsaffinität des Glukagons zu seinem Rezeptor, ebenso wie eine herabgesetzte cAMP-Produktion in der Zelle (Unson et al. 1996). Durch Konstruktion verschiedener Glukagon/GLP-1 Rezeptor Chimäre wurde deutlich, dass der proximale Anteil der N-terminalen Domäne, die erste extrazelluläre Schleife und die transmembranären Domänen III, IV und VI wichtig für die Bindung von Glukagon an seinen Rezeptor sind (Buggy et al. 1995, Unson et al. 1998).

Im GRF Rezeptor bewirkt der Austausch der Aminosäure Asparaginsäure an Position 60 in der N-terminalen Domäne gegen Glycin einen kompletten Bindungsverlust von GRF an seinen Rezeptor (Lin et al. 1993). Daraufhin untersuchten Carruthers et al. die entsprechende konservierte Aminosäure an Position 64 des Glukagon Rezeptors und konnten beim Austausch dieser Asparaginsäure sowohl gegen Glutaminsäure als auch gegen Asparagin, Lysin und Glycin den Bindungsverlust von Glukagon mit diesen mutierten Rezeptoren nachweisen (Carruthers et al. 1994).

Holtmann et al. untersuchten Chimäre, bei denen Anteile der Aminosäuresequenz des VIP Rezeptors und des Sekretin Rezeptors miteinander ausgetauscht wurden. Dabei stellten sie fest, dass die N-terminale Domäne des VIP Rezeptors auf dem Rest des Sekretin Rezeptors ausreichend für eine dem Wildtyp entsprechende Bindung von VIP und anschließender Zellaktivierung ist. Umgekehrt bewirkte die N-terminale Domäne des Sekretin Rezeptors auf dem Rest des VIP Rezeptors nur eine extrem abgeschwächte Zellaktivierung ohne Nachweis einer Bindung von Sekretin an die Chimäre. Wurde aber zu der N-terminalen Domäne des Sekretin Rezeptors auch die erste extrazelluläre Schleife in den VIP Rezeptor mutiert, bewirkte dies wiederum eine Bindung und Zellaktivierung durch Sekretin wie beim Wildtyp Sekretin Rezeptor (Holtmann et al. 1995).

Bei Untersuchungen mit GIP/GLP-1 Rezeptor Chimären konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz der N-terminalen Domäne des GIP Rezeptors bis Position 132 ausreichend ist, um GIP zu binden (Gelling et al. 1997). Um neben der Bindung auch eine cAMP-Antwort in der Zelle auszulösen, ist die Aminosäuresequenz bis Position 222 innerhalb der dritten transmembranären Domäne notwendig.

Bei der Interaktion von Calcitonin und seinem Rezeptor scheint die N-terminale Domäne des Rezeptors wichtig für die Bindung zu sein. Der Rest des Rezeptors ist entscheidend für die Aktivierung der Adenylatzyklase, wobei eine messbare Bindung

von Calcitonin an seinen Rezeptor scheinbar nicht entscheidend ist (Stroop et al. 1995). Bei diesen Untersuchungen wurden Chimäre vom Glukagon Rezeptor und Calcitonin Rezeptor hergestellt, die jeweils die N-terminale Domäne des anderen Rezeptors enthalten. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne des Glukagon Rezeptors wichtig für die Bindungsaffinität und Signaltransduktion ist, aber das alleinige Vorhandensein dieser nicht zur Bindung und Zellaktivierung ausreicht.

Auch für den Parathormon Rezeptor und den PACAP Rezeptor konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne relevant für die Bindung vom Peptid an seinen Rezeptor ist (Jüppner et al. 1994, Cao et al. 1995). Die Deletion von Aminosäure 37-41 im N-terminalen Ende des PTH Rezeptors bewirkt ebenso wie die Deletion von Aminosäure 431-440 in der dritten extrazellulären Schleife einen kompletten Bindungsverlust von PTH (Lee et al. 1994).

Scheinbar ist aber die Bindung von Ligand und Rezeptor kein Garant für ein Signal in die Zelle. Bei den hier vorliegenden Versuchen hatte die Kombination [Q9]-GLP-1/GLP-1 Rezeptor eine ähnlich grosse Bindungsaffinität wie GLP-1/GLP-1 Rezeptor, aber die cAMP-Ausschüttung in der Zelle war signifikant geringer. Holtmann et al. zeigten beim Sekretin Rezeptor, dass VIP an diesen sehr gut bindet, aber mit dieser Bindung keine Zellaktivierung bewirken kann (Holtmann et al. 1995). Bei der Untersuchung von Sekretin Rezeptor/VIP Rezeptor Chimären fiel eine Chimäre auf. Basierend auf dem VIP Rezeptor enthielt sie die N-terminale Domäne und die Aminosäuren 179-185 der ersten extrazellulären Schleife des Sekretin Rezeptors. Diese Chimäre bindet Sekretin ebenso gut wie der Wildtyp Rezeptor. Sekretin ist aber nicht in der Lage, eine Zellantwort in Form von cAMP-Produktion auszulösen (Holtmann et al. 1996).

Das Histidin an Position 178 am C-terminalen Ende der ersten intrazellulären Schleife des Glukagon Rezeptors ist in der gesamten Klasse B der G-Protein-bindenden Rezeptoren konserviert. Der Austausch dieses Histidins gegen Arginin bewirkt beim Parathormon Rezeptor und beim VIP Rezeptor eine verstärkte Gs-Protein Aktivierung (Schipani et al. 1995, Gaudin et al. 1998), während er beim GLP-1 Rezeptor, beim GIP Rezeptor und beim Calcitonin Rezeptor diese Wirkung nicht hat (Heller et al. 1996, Cohen et al. 1997, Tseng et al. 1997). Beim Glukagon Rezeptor wurde bei dieser Punktmutation eine erhöhte Peptid/Rezeptor Bindung und eine erhöhte cAMP-

Produktion festgestellt (Hjorth et al. 1998). Diese Ergebnisse konnten Cypess et al. (Cypess et al. 1999) nicht reproduzieren.

Die Aminosäuresequenz 175-177 (Asparagin-Tyrosin-Isoleucin) am Ende der ersten intrazellulären Schleife des Glukagon Rezeptors ist ausserdem essentiell für die intrazelluläre Verarbeitung und anschliessende Rezeptorexpression (Cypess et al. 1999).

Die Asparaginsäure an Position 198 des GLP-1 Rezeptors direkt neben dem hier untersuchten Lysin ist in der Klasse B der GPCR durchgehend konserviert. Daher wurde die Relevanz dieser Aminosäure in einigen Klasse B Rezeptoren bezüglich Bindungsaffinität und Zellaktivierung untersucht. Du et al. tauschten diese Asparaginsäure gegen Alanin aus. Der Austausch bewirkte einen kompletten Bindungsverlust von VIP an diesem Rezeptor. Ausserdem war die cAMP-Produktion im Vergleich zum Wildtyp Rezeptor um das 500fache herabgesetzt (Du et al. 1997). Auch im Sekretin Rezeptor bewirkt allein schon die Mutation von Asparaginsäure zu Asparagin eine herabgesetzte Bindungsaffinität und Zellaktivierung durch Sekretin (Di Paolo et al. 1998). Beim GLP-1 Rezeptor bewirkt der Austausch der Asparaginsäure mit Asparagin keine abgeschwächte Bindungsaffinität und Zellaktivierung durch GLP-1. Beim Austausch mit Alanin kann eine Bindung zu GLP-1 nicht mehr nachgewiesen werden, auch wenn noch eine Zellaktivierung durch GLP-1 stattfindet. Diese ist aber im Vergleich zum Wildtyp Rezeptor um das 60fach herabgesetzt (Lopez de Maturana und Donnelly 2002). Xiao et al. detektierten dagegen eine 10fache Reduktion der Bindungsaffinität und eine Reduktion der Zellaktivierung um 80% beim Austausch von Asparaginsäure mit Alanin im GLP-1 Rezeptor an Position 198 (Xiao et al. 2000). Die Deletion der Aminosäuren 252-259 in der zweiten intrazellulären Schleife des humanen Glukagon Rezeptors bewirkt eine abgeschwächte Aktivierung der Adenylatzyklase, obwohl die Bindungsaffinität zu Glukagon im Vergleich zum Wildtyp Rezeptor um ein 4faches steigt (Chicchi et al. 1997). Der durch die Bindung von Glukagon und mutiertem Rezeptor entstehende Komplex ist nicht mehr in der Lage, das Gs-Protein zu stimulieren, das die Adenylatzyklase aktiviert.

Es konnte auch gezeigt werden, dass die dritte intrazelluläre Schleife im GLP-1 Rezeptor essentiell für die Aktivierung der Adenylatzyklase ist (Heller et al. 1996). Takhar et al. kamen zum gleichen Ergebnis (Takhar et al. 1996) und die Arbeitsgruppe um Wheeler bewies später, dass die dritte intrazelluläre Schleife am Übergang von der fünften transmembranären Helix besonders wichtig für die Bindung des Gs-Proteins

ist. Spezifische Mutationen der dritten intrazellulären Schleife führen zum Verlust der Kopplung der Adenylatzyklase (Mathi et al. 1997). Weiterhin wiesen sie nach, dass GLP-1 bei diesen Mutationen keinen Anstieg der cAMP-Konzentration bewirkt. Wird GLP-1 auf HIT-T15 Zellen mit diesen Rezeptorchimären gegeben, wird keine Insulinproduktion mehr ausgelöst (Salapatek et al. 1999).

Dass die dritte intrazelluläre Schleife des GLP-1 Rezeptors wichtig für die Aktivierung verschiedener G-Proteine ist, zeigten Hallbrink et al. (Hallbrink et al. 2001). Diesen Versuchen ging der Nachweis voraus, dass GLP-1 über den GLP-1 Rezeptor nicht nur die Adenylatzyklase, sondern auch die Phospholipase C über G-Proteine aktiviert (Wheeler et al. 1993, Monterose-Rafizadeh et al. 1999).

Im Glukagon Rezeptor sind die zweite und dritte intrazelluläre Schleife nötig für die Stimulierung vom Gs- und Gq-Protein zur Aktivierung der Adenylatzyklase und der Phospholipase C. Der alleinige Wegfall einer der beiden Schleifen schwächt die Aktivierung ab. Wenn beide Schleifen nicht vorhanden sind, können die zwei Signalwege nicht ablaufen (Cypess et al. 1999).

Beim Parathormon Rezeptor konnte gezeigt werden, dass das Lysin an Position 319 in der zweiten intrazellulären Schleife essentiell für die Stimulierung des Gq-Proteins ist, welches die Phospholipase C aktiviert (Iida-Klein et al. 1997). Der N-terminale Bereich der dritten intrazellulären Schleife im Parathormon Rezeptor ist ebenfalls wichtig für die über das Gq- bzw. Gs-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C und der Adenylatzyklase (Huang et al. 1996). Auch im PACAP Rezeptor ist die dritte intrazelluläre Schleife wichtig für die Aktivierung von Adenylatzyklase und Phospholipase C. Dies wurde speziell für den C-terminalen Bereich der Schleife gezeigt (Spengler et al. 1993).

Am Parathormon Rezeptor sind die letzten 91 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Rezeptors nicht relevant für die Internalisierung des Peptid/Rezeptor Komplexes, während das Fehlen des N-terminalen Teils des intrazellulären Endes des Rezeptors (Aminosäure 475-494) zum Verlust der Internalisierung führt (Huang et al. 1995). Jüppner et al. trunkierten den Rezeptor ab Aminosäure 480 und konnten bei dieser Mutante keinen Bindungsverlust von Parathormon an den Rezeptor feststellen (Jüppner et al. 1994). Beim Calcitonin Rezeptor des Schweins bewirkt das Fehlen der letzten 44 oder 83 Aminosäuren eine herabgesetzte Internalisierung des Peptid/Rezeptor Komplexes und damit verbunden eine abgeschwächte Ausschüttung von cAMP und Ca^{2+} (Findlay et al. 1994). Die C-terminale Domäne des GIP Rezeptors

bis Aminosäure 400 ist wichtig für die Bindung von GIP an seinen Rezeptor und die Rezeptorinternalisierung in die Zelle. Für letztere scheint auch das Serin an Position 426 und 427 entscheidend zu sein (Wheeler et al. 1999). Der Grossteil der Aminosäuresequenz nach der siebten transmembranären Domäne am C-terminalen Ende des Glukagon Rezeptors (ab Aminosäure 416) ist nicht relevant für die Peptid/Rezeptor Bindung und die cAMP-Produktion (Unson et al. 1995, Buggy et al. 1997). Das Fehlen des N-terminalen Teils des intrazellulären Endes des Rezeptors (Aminosäure 406-415) führt zum Verlust der Rezeptorexpression an der Zelloberfläche. Dies wurde an einer an dieser Stelle mutierten Chimäre (Cypess et al. 1999) und an dieser Stelle trunkierten Chimäre (Buggy et al. 1997) nachgewiesen.

Unson et al. konnten zeigen, dass am Glukagon das Histidin an Position 1 essentiell für die Rezeptorbindung und Signaltransduktion ist (Unson et al. 1993). Ausserdem konnten sie nachweisen, dass die Asparaginsäure an Position 9 für die Signaltransduktion entscheidend ist (Unson et al. 1991). Sie wird dabei durch die Asparaginsäuren an Position 15 und 21 unterstützt (Unson et al. 1994a). Das Serin an Position 16 ist ebenfalls essentiell für die Signaltransduktion, während das Serin an Position 11 an der Rezeptorbindung beteiligt ist (Unson et al. 1994b). Aufgrund dieser Erkenntnisse postulierten Unson et al. His1, Asp9 und Ser16 als eine gemeinsam wirkende Triade für die Signaltransduktion am Glukagon Rezeptor und waren in der Lage mehrere hochaktive Glukagon Antagonisten zu synthetisieren, die an den entsprechenden Positionen in der Aminosäuresequenz verändert sind (Unson et al. 1994c).

Gallwitz et al. suchten nach den Komponenten des GLP-1(7-36)amids, die wichtig für eine erfolgreiche Interaktion von Peptid und Rezeptor sind. Sie stellten in ihren Versuchen fest, dass die trunkierten GLP-1 Peptide GLP-1(21-36)amid und GLP-1(7-25) beide im Vergleich zum Wildtyp GLP-1 nicht mehr in der Lage sind, eine cAMP-Produktion in der Zelle auszulösen. Während GLP-1(21-36)amid noch eine schwache Bindung mit dem GLP-1 Rezeptor eingeht, kann mit GLP-1(7-25) keine Bindung mehr nachgewiesen werden (Gallwitz et al. 1990).

Harreter et al. zeigten, dass die positive Ladung am Imidazolring des Histidins an Position 7 (die erste Aminosäure des aktiven Peptids) essentiell für die Bindung des Peptids an den Rezeptor und die Ausschüttung von cAMP in der Zelle ist (Harreter et al. 1997).

Neben His7 sind ausserdem Gly10, Phe12, Thr13 und Asp15 des GLP-1 entscheidend für eine optimale Rezeptorbindung und Zellaktivierung (Adelhorst 1994). Kawai et al. zeigten am isoliert perfundierten Rattenpankreas, dass die Aminosäuren an Position 10, 15 und 17 des GLP-1 essentiell für die insulinotrope Wirkung an der β -Zelle sind (Kawai et al. 1991).

Hjorth et al. stellten fest, dass bei der Interaktion von Glukagon und Glukagon Rezeptor die nicht konservierten Aminosäuren des N-Terminus des Glukagons für die selektive Bindung entscheidend sind. Beim GLP-1 und seinem Rezeptor sind dagegen die nicht konservierten Aminosäuren des C-Terminus des GLP-1 für die selektive Bindung essentiell (Hjorth et al. 1994). Runge et al. bestätigten die Ergebnisse von Hjorth et al.. Anhand von GLP-1/Glukagon Chimären und GLP-1 Rezeptor/Glukagon Rezeptor Chimären konnten sie ausserdem zeigen, dass der C-Terminus der beiden Peptide mit der N-terminalen Domäne ihrer Rezeptoren interagiert. Der N-Terminus beider Peptide tritt mit dem Rest ihrer Rezeptoren in Kontakt und löst so eine Zellaktivierung aus (Runge et al. 2003a).

Vilardaga et al. zeigten für Sekretin, dass die Carboxy-Gruppe der Asparaginsäure an Position 3 essentiell für die Wirkung von Sekretin ist (Vilardaga et al. 1996). Das Gleiche gilt auch für GLP-1, was die Versuche in der hier vorliegenden Arbeit zeigten: Zwar haben GLP-1 und [Q9]-GLP-1 eine ähnliche Bindungsaffinität zum GLP-1 Rezeptor, aber [Q9]-GLP-1, bei dem die Glutaminsäure an Position 3 mit Glutamin ersetzt ist, bewirkte eine signifikant geringere cAMP-Ausschüttung in der Zelle. Die EC₅₀ für [Q9]-GLP-1 war sogar 12 mal grösser als die EC₅₀ von Glukagon am GLP-1 Rezeptor und 450 mal grösser als die EC₅₀ von [E3]-Glukagon, bei dem Glutaminsäure die Stelle von Glutamin an Position 3 einnimmt (s. Abb. 12).

Beim PACAP sind die ersten drei Aminosäuren des N-Terminus essentiell für die Rezeptorbindung und die Zellaktivierung. Dabei werden sie vom C-Terminus des Peptids unterstützt, der scheinbar für eine stabile Bindung entscheidend ist (Robberecht et al. 1992). So bewirkt z.B. der Austausch der Asparaginsäure an Position 3 gegen Glutaminsäure oder Asparagin eine um 30% respektive 60% geringere cAMP-Produktion.

Bergwitz et al. zeigten an PTH Rezeptor/Calcitonin Rezeptor Chimären, dass beim PTH und Calcitonin das C-terminale Ende des Peptids an das N-terminale Ende des jeweiligen Rezeptors bindet und das N-terminale Ende des Peptids an den

transmembranären Domänen des Rezeptors eine Zellaktivierung auslöst (Bergwitz et al. 1996).

Villardaga et al. fanden heraus, dass die Asparaginsäure an Position 3 des Sekretins scheinbar mit dem Lysin an Position 195 des Sekretin Rezeptors interagiert, um eine effektive Zellantwort zu erzeugen (Villardaga et al. 1996). Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse kann für GLP-1 nicht klar beantwortet werden, ob die Glutaminsäure an Position 3 des GLP-1 mit dem Lysin 197 des GLP-1 Rezeptors interagiert, da der Austausch von Lysin 197 im GLP-1 Rezeptor mit Isoleucin fast zum kompletten Verlust der cAMP-Ausschüttung von allen vier untersuchten Peptiden führte, im Gegensatz zu den Untersuchungen von Villardaga et al.. Diese Gruppe zeigte, dass der Lysin/Isoleucin Austausch im Sekretin Rezeptor zunächst nur eine geringe Abschwächung der cAMP-Produktion durch Sekretin bewirkt. Eine wesentlich geringere cAMP-Produktion ist an dieser Chimäre durch Peptide auszulösen, die an Position 3 nicht Asparaginsäure, sondern Glutamin oder Asparagin enthalten. Interessanterweise ist die cAMP-Produktion bei diesen beiden Peptiden gleich niedrig. Am Wildtyp Sekretin Rezeptor lösen sie dagegen eine sehr unterschiedliche Zellaktivierung aus. Dort löst Glu3-Sekretin im Gegensatz zu Sekretin eine 15fach geringere cAMP-Produktion aus, während die Zellantwort durch Asn3-Sekretin 500fach kleiner ist. Durch den Austausch des Lysins gegen Isoleucin an dieser Position des Sekretin Rezeptors kann dieser also nicht mehr zwischen Glutamin und Asparagin an Position 3 des Sekretins unterscheiden (Villardaga et al. 1996).

Solano et al. entwickelten anhand von Bindungsversuchen und cAMP Assays mit punktmutierten VIP Rezeptoren am Arginin 188 und Lysin 195 und der Asparaginsäure an Position 3 des VIP die nachvollziehbare Theorie, dass die positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin am Übergang von der ersten transmembranären Domäne zur ersten extrazellulären Schleife des VIP Rezeptors für die negativ geladene Asparaginsäure an Position 3 des VIP eine elektrophile Tasche bilden, um so eine Zellaktivierung auszulösen (Solano et al. 2001).

Beim Glukagon scheint das Glutamin an Position 3 nicht essentiell wichtig zu sein für die Interaktion von Glukagon und Glukagon Rezeptor und somit auch nicht speziell mit dem Isoleucin 195 am Glukagon Rezeptor zu interagieren. Die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigten, dass sowohl Glukagon als auch [E3]-Glukagon mit einer ähnlichen EC₅₀ eine Antwort in der Zelle auslösen. Am [K195]-Glukagon Rezeptor

war die maximale Zellantwort durch [E3]-Glukagon etwas grösser als durch Glukagon bei ähnlichen EC₅₀-Werten. Aber beide Peptide bewirkten am [K195]-Glukagon Rezeptor eine signifikant geringere Ausschüttung von cAMP. Das Isoleucin an dieser Stelle des Glukagon Rezeptors ist also bedeutend für eine effektive Wirkung von Glukagon, aber nicht so wichtig wie das Lysin für den GLP-1 Rezeptor an der entsprechenden Stelle.

Perret et al. untersuchten basierend auf den Ergebnissen von Solano et al., ob beim Glukagon die Aminosäure Lysin 188 und Isoleucin 195 des Glukagon Rezeptors mit dem Glutamin an Position 3 des Glukagon interagieren (Perret et al. 2002). Sie tauschten die Aminosäuren 188 und 195 entsprechend gegen Arginin und Lysin aus. Diese Aminosäuren nehmen im Rest der Klasse B der GPCR die entsprechenden Positionen ein. So entstanden drei Rezeptoren: K188R, I195K und K188R/I195K. Das Glutamin an Position 3 tauschten sie gegen Asparaginsäure und Glutaminsäure aus. Diese Aminosäuren findet man an Position 3 der Peptide der anderen Klasse B GPCR. Am Wildtyp Rezeptor war die Zellaktivierung mit den an Position 3 veränderten Glukagon Peptiden um 80% geringer, anders als bei den hier vorliegenden Ergebnissen. Der alleinige Austausch von Lysin 188 zu Arginin (K188R) hatte im Vergleich zum Wildtyp Rezeptor keine Folgen auf die Zellaktivierung. Der alleinige Austausch von Isoleucin 195 zu Lysin (I195K) bewirkte eine abgeschwächte Zellaktivierung durch Glukagon und den veränderten Glukagon Peptiden, wobei die veränderten Peptide eine stärkere Zellantwort als Glukagon verursachten, übereinstimmend mit den Versuchen in dieser Arbeit (s.Abb.11). Der Austausch beider Aminosäuren am Rezeptor (K188R/I195K) bewirkte eine gering abgeschwächte Zellaktivierung durch Glukagon, aber die veränderten Glukagon Peptide aktivierten die Zelle über diesen Rezeptor genauso gut. Dieser Rezeptor konnte also nicht mehr zwischen Glukagon und Peptiden unterscheiden, die den anderen Klasse B GPCR Peptiden ähnlich sind. Perret et al. schlossen aus diesen Ergebnissen, dass das Isoleucin an Position 195 als eine Art Schild vor dem Lysin 188 wirkt, so dass nur das dem Glukagon spezifische Glutamin an Position 3 mit dem Rezeptor in diesem Bereich interagiert und so der Rezeptor Glukagon von den anderen Klasse B GPCR Peptiden unterscheiden kann.

Runge et al. untersuchten, ob verschiedene Epitope im Glukagon Rezeptor relevant für die Selektivität von Glukagon an seinem Rezeptor sind (Runge et al. 2003b). Dabei testeten sie auch die Auswirkung des Austauschs von Glutamin an Position 3 von

Glukagon mit Glutaminsäure an Position 9 von GLP-1 auf die Bindung und Zellaktivierung der Wildtyp Rezeptoren. [Q9]-GLP-1 band genauso gut an den GLP-1 Rezeptor wie GLP-1. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen in dieser Arbeit überein. Ausserdem aktivierte [Q9]-GLP-1 in gleicher Masse die Zelle über den GLP-1 Rezeptor wie GLP-1, im Gegensatz zu den hier erarbeiteten Ergebnissen, bei denen [Q9]-GLP-1 die Zelle über den GLP-1 Rezeptor schlechter aktiviert als GLP-1 (s.Abb.11). Runge et al. stellten auch fest, dass sowohl die Bindung als auch die Zellaktivierung von [E3]-Glukagon über den Glukagon Rezeptor im Vergleich zum Glukagon schlechter war. Auch dabei kommt die hier vorliegende Arbeit zu anderen Ergebnissen: Die Bindung konnte aus oben erläuterten technischen Gründen zwischen [E3]-Glukagon und dem Glukagon Rezeptor nicht untersucht werden. Die Zellaktivierung über den Glukagon Rezeptor war durch [E3]-Glukagon und Glukagon fast gleich. Ausserdem tauschten Runge et al. das C-terminale Ende der zweiten transmembranären Domäne des Glukagon Rezeptors mit der entsprechenden Aminosäuresequenz des GLP-1 Rezeptors aus. Die Aminosäuren 188-198 des Glukagon Rezeptors wurde durch die Aminosäuren 190-200 des GLP-1 Rezeptors ersetzt. Sie führten mit dieser Chimäre Bindungsversuche und cAMP Assays mit Glukagon und [E3]-Glukagon durch. Dabei stellte sich heraus, dass [E3]-Glukagon besser an diese Glukagon Rezeptor Chimäre band als Glukagon. Die Zellaktivierung durch [E3]-Glukagon und Glukagon war mit der Chimäre gleich aber insgesamt geringer als beim Wildtyp Rezeptor. Dabei unterscheiden sich die Ergebnisse mit den hier vorliegenden Untersuchungen und den Versuchen von Peret et al., bei denen [E3]-Glukagon den mutierten Rezeptor stärker stimuliert als Glukagon (s.o.). Das kann daran liegen, dass Runge et al. nicht nur eine sondern 11 Aminosäuren ausgetauscht haben, so dass diese Versuche nicht direkt miteinander vergleichbar sind.

Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse scheint das Isoleucin an Position 195 des Glukagon Rezeptors wichtig für eine effektive Zellaktivierung durch Glukagon zu sein. Das Glutamin an Position 3 des Glukagons scheint nicht speziell mit diesem Isoleucin zu interagieren und kann ohne Wirkungsveränderung auch gegen Glutaminsäure ausgetauscht werden.

Die Ergebnisse bezüglich des Glukagon und Glukagon Rezeptors unterscheiden sich von Ergebnissen anderer Autoren, die eine selektive Interaktion von Glutamin an

Position 3 des Glukagons mit Arginin an Position 188 und Isoleucin an Position 195 des Glukagon Rezeptors vermuten (Perret et al. 2002, Runge et al. 2003b).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Lysin an Position 197 des GLP-1 Rezeptors nicht relevant für die selektive Wirkung von GLP-1 am GLP-1 Rezeptor ist. Trotzdem ist es mit seiner positiven Ladung essentiell für die Wirkung überhaupt.

Ob die Glutaminsäure an Position 9 des GLP-1 mit dem Lysin an Position 197 des GLP-1 Rezeptors interagiert, konnte nicht eindeutig belegt werden. Sie scheint für die Bindung von Peptid und Rezeptor nicht essentiell zu sein, was die Ergebnisse anderer Autoren bestätigen (Hjorth et al. 1994, Runge et al 2003a). Dass die Carboxy-Gruppe der Glutaminsäure an Position 9 des GLP-1 aber essentiell wichtig für die Wirkung an seinem Rezeptor ist, konnte gezeigt werden.

Zusammenfassung

Die Probleme, die die Therapie der Volkskrankheit Diabetes mellitus aufwerfen, sind noch lange nicht gelöst. Das Hormon GLP-1(7-36)amid ist seit Jahren ein viel untersuchter Kandidat für die Therapie des Diabetes mellitus. Es hat vielfältige positive Wirkungen auf den Glukosehaushalt und im Vergleich zu anderen Antidiabetika geringe Nebenwirkungen. So führt es z.B. nicht zu der gefürchteten Hypoglykämie. Leider weist GLP-1 aber auch Eigenschaften auf, die die Nutzung des Hormons als Therapeutikum erschweren. So hat GLP-1 unter anderem nur eine geringe Halbwertszeit im Blut und wird schlecht vom Darm absorbiert. Daher ist es notwendig, dieses Hormon und die Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen GLP-1 und seinem Rezeptor zu untersuchen, um so mögliche Angriffspunkte für die Entwicklung synthetischer, als Therapeutikum nutzbarer Analoga zu finden.

Der GLP-1 Rezeptor gehört in eine kleine Untergruppe der grossen Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen, den Klasse B Sekretin- ähnlichen Rezeptoren. Sie weisen untereinander eine grosse Homologie auf. In dieser Arbeit wurde das Wissen um die Struktur-Wirkungsbeziehung dieser Rezeptoren und ihrer Hormone genutzt, um mehr über GLP-1 und seinen Rezeptor zu erfahren. So konnte erstmals gezeigt werden, dass der GLP-1 Rezeptor nicht wie der Sekretin Rezeptor seine Selektivität verliert, wenn das Lysin an Position 197 gegen das nicht konservierte Isoleucin an der entsprechenden Position 195 des Glukagon Rezeptors ausgetauscht wird. Er verliert durch diese Veränderung sogar fast komplett die Fähigkeit, ein Signal in die Zelle weiterzugeben. Dazu wurden mit Hilfe von rekombinanter PCR die Chimäre [I197]-GLP-1 Rezeptor und [K195]-Glukagon Rezeptor hergestellt und durch Sequenzieren auf Richtigkeit überprüft. COS-7 Zellen wurden transient mit diesen Chimären und den Wildtyp Rezeptoren transfiziert. Erfolgreiche Transfektion wurde durch Western blot bestätigt. Weiterhin wurden unter Befolgung der Fmoc/tBu Strategie vier Peptide nach der Fest-Phasen Methode mittels eines SyRo II „multiple peptide synthesizers“ synthetisiert: GLP-1, Glukagon und die 2 Analoga [Q9]-GLP-1 und [E3]-Glukagon, bei denen die Aminosäuren Glutaminsäure und Glutamin an Position 3 ihrer Wildtyp Hormone förmlich miteinander ausgetauscht wurden.

Um so zu überprüfen, ob diese Aminosäuren an Position 3 mit Lysin 197 oder Isoleucin 195 ihrer Wildtyp Rezeptoren interagieren und diese Aminosäuren der

Rezeptoren wiederum für die Selektivität ihrer Ligandenwirkung verantwortlich sind, wurde versucht, Bindungsassays und cAMP-Assays mit allen möglichen 16 Kombinationen von Ligand und Rezeptor durchzuführen. Für die Bindungsassays wurden die Liganden nach der von Göke und Conlon (Göke und Conlon 1988a) beschriebenen Iodogenmethode mit ^{125}Jod markiert. Dabei zerbrach das Analogon [E3]-Glukagon wiederholt, so dass für die Bindungsassays nur 12, für die cAMP-Assays alle 16 Kombinationen durchgeführt werden konnten. Durch den Verlust der Zellaktivierung beim GLP-1 Rezeptor nach Austausch einer einzelnen Aminosäure war es nicht möglich, eine Aussage über die Interaktion zwischen der Glutaminsäure an Position 3 des GLP-1 und des Lysins an Position 197 des GLP-1 Rezeptors zu machen. Es konnte aber erstmals gezeigt werden, dass die Carboxy-Gruppe der Glutaminsäure an Position 3 des GLP-1 essentiell für die Zellaktivierung durch den GLP-1 Rezeptor ist. Ausserdem konnte nachgewiesen werden, dass das Isoleucin 195 des Glukagon Rezeptors wichtig für die Zellaktivierung durch Glukagon ist. Es konnte auch gezeigt werden, dass das Glutamin an Position 3 des Glukagons nicht essentiell für die cAMP-Produktion der Zelle ist und nicht speziell mit dem Isoleucin 195 des Glukagon Rezeptors in Interaktion tritt.

Bibliographie

- Abrahamsen,-E; Nishimura,-E** 1995 Regulation of glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger ribonucleic acid expression in cultured rat pancreatic islets by glucose, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glucocorticoids. *Endocrinology*. 1995; 136:1572-1578
- Adelhorst,-K; Hedegaard,-B,-B; Knudsen,-L,-B; Kirk,-O** 1994 Structure-activity studies of glucagon-like peptide-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994 March; 269(9):6275-78
- Ahren,-B; Larsson,-H; Holst,-J-J** 1997 Effects of glucagon-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997 Feb; 82(2):473-8
- Ahren,-B; Pacini,-G** 1999 Dose-related effects of GLP-1 on insulin secretion, insulin sensitivity, and glucose effectiveness in mice. *The American Journal of Physiology*. 1999 Dec; 277(6 Pt 1):E996-E1004
- Ahren,-B; Holst,-J-J; Martensson,-H; Balkan,-B** 2000 Improved glucose tolerance and insulin secretion by inhibition of dipeptidyl peptidase IV in mice. *The European Journal of Pharmacology*. 2000 Sep 15; 404(1-2):239-45
- Al-Barazanji,-K-A; Arch,-J-R; Buckingham,-R-E; Tadayyon,-M** 2000 Central exendin-4 infusion reduces body weight without altering plasma leptin in (fa/fa) Zucker rats. *Obesity Research*. 2000 Jul; 8(4):317-23
- Alberts,-B; Bray,-D; Lewis,-J; Raff,-M; Roberts,-K; Watson,-J** 1994 *Molecular biology of the cell*. 3rd ed. pp. 731-759. 1994. Garland Publishing, Inc.. New York
- Andreis,-P-G; Malendowicz,-L-K; Neri,-G; Tortorella,-C; Nussdorfer,-G-G** 1999 Effects of glucagon and glucagon-like peptide-1 on glucocorticoid secretion of dispersed rat adrenocortical cells. *Life Sciences*. 1999; 64(24):2187-97
- Arnould,-Y; Bellens,-R; Franckson,-J-R-M; Conard,-V** 1963 Insulin response and glucose-C14 disappearance rate during the glucose tolerance test in the unanesthetized dog. *Metabolism*. 1963; 12:1122-1131
- Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft** 2002 Empfehlungen zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. *Arzneiverordnung in der Praxis*. 2002 (1. Auflage) Sonderheft.
- Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft** 2006 UAW-News-International. Tödliches Leberversagen unter Pioglitazon. *Deutsches Ärzteblatt*.

2006; 103(13):753

- Baggio,-L; Adatia,-F; Bock,-T; Brubaker,-P-L; Drucker,-D-J** 2000 Sustained expression of exendin-4 does not perturb glucose homeostasis, beta-cell mass, or food intake in metallothionein-preproexendin transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000 Nov 3; 275(44):34471-7
- Baggio,-L-L; Huang,-Q; Brown,-T-J; Drucker,-D-J** 2004 A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (Albugon) mimics peptideric activation of GLP-1 receptor-dependents pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis. *Diabetes*. 2004; 53:2492-2500
- Bailey,-C-J; Turner,-R-C** 1996 Metformin. *The New England Journal of Medicine*. 1996; 334:574-9
- Balfour,-J-A; Faulds,-D** 1998 Repaglinide. *Drugs Aging*. 1998; 13:173-80
- Balkan,-B; Kwasnik,-L; Miserendino,-R; Holst,-J-J; Li,-X** 1999 Inhibition of dipeptidyl peptidase IV with NVP-DPP728 increases plasma GLP-1 (7-36 amide) concentrations and improves oral glucose tolerance in obese Zucker rats. *Diabetologia*. 1999 Nov; 42(11):1324-31
- Balks,-H-J; Holst,-J-J; von-zur-Muhlen,-A; Brabant,-G** 1997 Rapid oscillations in plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in humans: cholinergic control of GLP-1 secretion via muscarinic receptors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997 Mar; 82(3):786-90
- Barber,-D-L; Cacace,-A-M; Raucci,-D-T; Ganz,-M-B** 1991 Fatty acids stereospecifically stimulate neurotensin release and increase $[Ca^{2+}]_i$ in enteric endocrine cells. *The American Journal of Physiology*. 1991; 261:G497-G503
- Barragan,-J-M; Rodriguez,-R-E; Eng,-J; Blazquez,-E** 1996 Interactions of exendin-(9-39) with the effects of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide and of exendin-4 on arterial blood pressure and heart rate in rats. *Regulatory Peptides*. 1996 Nov 14; 67(1):63-8
- Barragan,-J-M; Eng,-J; Rodriguez,-R; Blazquez,-E** 1999 Neural contribution to the effect of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on arterial blood pressure in rats. *The American Journal of Physiology*. 1999 Nov; 277(5 Pt 1):E784-91
- Baum,-J; Simons Jr,-B-E; Unger,-R-H; Madison,-L-L** 1962 Localization of glucagon in the α cells in the pancreatic islet by immunofluorescent techniques. *Diabetes*. 1962; 11:371-374
- Bayliss,-W-M; Starling, E-H** 1902 Mechanism of pancreatic secretion. *The Journal of*

Physiology. 1902; 28:235-334

- Beak,-S-A; Small,-C-J; Ilovaiskaia,-I; Hurley,-J-D; Ghatei,-M-A; Bloom,-S-R; Smith,-D-M** 1996 Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) releases thyrotropin (TSH): characterization of binding sites for GLP-1 on alpha-TSH cells. *Endocrinology*. 1996 Oct; 137(10): 4130-8
- Beauvais,-A; Monod,-M; Wyniger,-J; Debeaupuis,-J-P; Grouzmann,-E; Brakch,-N; Svab,-J; Hovanessian,-A-G; Latge,-J-P** 1997 Dipeptidyl-peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans. *Infection and Immunity*. 1997 Aug; 65(8):3042-7
- Bell,-G-I; Santerre,-R-F; Mullenbach,-G-T** 1983a Hamster proglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature*. 1983; 302:716-718
- Bell,-G-I; Sanchez-Pescador,-R; Laybourn,-P-J; Najarian,-R-C** 1983b Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene. *Nature*. 1983; 304:368-371
- Bell,-G-I** 1986 The glucagon superfamily: precursor structure and gene organization. *Peptides*. 1986; 7[Suppl 1]:27-36
- Benito,-E; Blazquez,-E; Bosch,-M-A** 1998 Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide increases pulmonary surfactant secretion through a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase mechanism in rat type II pneumocytes. *Endocrinology*. 1998 May; 139(5):2363-8
- Berghofer,-P; Peterson,-R-G; Schneider,-K; Fehmann,-H-C; Goke,-B** 1997 Incretin hormone expression in the gut of diabetic mice and rats. *Metabolism*. 1997 Mar; 46(3):261-7
- Bergwitz,-C; Gardella,-T-J; Flannery,-M-R; Potts,-J-T,Jr; Kronenberg,-H-M; Goldring,-S-R; Jüppner,-H** 1996 Full activation of chimeric receptors by hybrids between parathyroid hormone and calcitonin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271:26469-72
- Blache,-P; Kervran,-A; Bataille,-D** 1988 Oxyntomodulin and glicentin: brain-gut peptides in the rat. *Endocrinology*. 1988; 123:2782-2787
- Bloom,-S-R; Polak,-J-M** 1982 The hormonal pattern of intestinal adaptation. A major role for enteroglucagon. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 1982; 74:93-103
- Bode,-H-P; Moormann,-B; Dabew,-R; Goke,-B** 1999 Glucagon-like peptide 1 elevates cytosolic calcium in pancreatic beta-cells independently of protein kinase A. *Endocrinology*. 1999 Sep; 140(9):3919-27

- Bojanowska,-E; Stempniak,-B** 2000 Effects of centrally or systemically injected glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on release of neurohypophysial hormones and blood pressure in the rat. *Regulatory Peptides*. 2000 Jul 28; 91(1-3):75-81
- Brange,-J; Owens,-D-R; Kang,-S; Volund,-A** 1990 Monomeric insulins and their experimental and clinical implications. *Diabetes Care*. 1990;13:923-954
- Brown,-J-C; Pederson,-R-A; Jorpes,-E; Mutt,-V** 1969 Preparation of highly active enterogastrone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1969; 47:113-114
- Brown,-J-C; Mutt,-V; Pederson,-R-A** 1970 Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity. *The Journal of Physiology*. 1970; 209:57-64
- Brown,-J-C; Pederson,-R-A** 1970 A multiparameter study of the action of preparations containing cholecystokinin-pancreozymin. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1970; 5:537-541
- Brown,-J-C** 1971 A gastric inhibitory polypeptide. I. The amino acid composition and the tryptic peptides. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1971; 49:255-261
- Brown,-J-C; Dryburgh,-J-R** 1971 A gastric inhibitory polypeptide. II. The complete amino acid sequence. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1971; 49:867-872
- Brown,-J-C** 1974 Gastric inhibitory polypeptide (GIP). In: Taylor,-S (Herausgeber). *Endocrinology*. Heinemann, London. 1974. 276-284
- Brown,-J-C; Pederson,-R-A** 1976 GI hormones and insulin secretion. In: James,-V-H-T (Herausgeber) 5th International Congress on Endocrinology vol 2. *Excerpta Medica*, Hamburg. 1976. 568-570
- Brubaker,-P-L; Vranic,-M** 1987 Fetal rat intestinal cells in monolayer culture: a new in vitro system to study the glucagon-like immunoreactive peptides. *Endocrinology*. 1987; 120:1976-1985
- Brubaker,-P-L** 1991 Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by intestinal regulatory peptides. *Endocrinology*. 1991; 128:3175-3182
- Brubaker,-P-L; Lee,-Y-C; Drucker,-D-J** 1992 Alterations in proglucagon processing and inhibition of proglucagon gene expression in transgenic mice which contain a chimeric proglucagon-SV40 T antigen gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992; 67:20728-20733.
- Brubaker,-P-L; Schloos,-J; Drucker,-D-J** 1998 Regulation of glucagon-like peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line. *Endocrinology*. 1998; 124:3003-3009

- Bruzzone,-R; Tamburrano,-G; Lala,-A; Mauceri,-M; Annibale,-B; Severi,-C; DeMagistris,-L; Lonetti,-F; DelleFave,-G** 1983 Effect of bombesin on plasma insulin, pancreatic glucagon, and gut glucagon in man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1983; 56:643-647
- Bryant,-M-G; Bloom,-S-R; Polak,-J-M** 1983 Measurement of gut hormonal peptides in biopsies from human stomach and proximal intestine. *Gut*. 1983; 24:114-119
- Brynes,-A-E; Frost,-G-S; Edwards,-C-M; Ghatei,-M-A; Bloom,-S-R** 1998 Plasma glucagon-like peptide-1 (7-36) amide (GLP-1) response to liquid phase, solid phase, and meals of differing lipid composition. *Nutrition*. 1998 May; 14(5):433-6
- Buchan,-A-M; Ingman-Baker,-J; Levy,-J; Brown,-J-C** 1982 A comparison of the ability of serum and monoclonal antibodies to gastric inhibitory polypeptide to detect immunoreactive cells in the gastroenteropancreatic system of mammals and reptiles. *Histochemistry*. 1982; 76:341-349
- Buchan,-A-M-J; Barber,-D-L; Gregor,-M; Soll,-A-H** 1987 Morphologic and physiologic studies of canine ileal enteroglucagon-containing cells in short-term culture. *Gastroenterology*. 1987; 93:791-800
- Buffa,-B; Polak,-J-M; Pearse,-A-G-E; Solcia,-E; Grimelius,-L; Capella,-C** 1975 Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory polypeptide. *Histochemistry*. 1975; 43:249-255
- Buggy,-J-J; Livingston,-J-N; Rabin,-D-U; Yoo-Warren,-H** 1995 Glucagon-like peptide receptor chimeras reveal domains that determine specificity of glucagon binding. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270:7474-7478
- Buggy,-J-J; Heurich,-R-O; MacDougall,-M; Kelley,-K-A; Livingston,-J-N; Yoo-Warren,-H; Rossomando,-A-J** 1997 Role of the glucagon receptor COOH-terminal domain in glucagon-mediated signaling and receptor internalization. *Diabetes*. 1997; 46:1400-05
- Bullock,-B-P; Heller,-R-S; Habener,-J-F** 1996 Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology*. 1996 Jul; 137(7):2968-78
- Bunnett,-N-W; Harrison,-F-A** 1986 Immunocytochemical localization of gastric inhibitory polypeptide and glucagon in the alimentary tract of ruminants. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 1986; 71:433-441
- Burcelin,-R; Dolci,-W; Thorens,-B** 1999 Long-lasting antidiabetic effect of a dipeptidyl peptidase IV-resistant analog of glucagon-like peptide-1. *Metabolism*.

1999 Feb; 48(2): 252-8

- Byrne,-M-M; Göke,-B** 1997 Lessons from human studies with glucagon-like peptide-1: potential of the gut hormone for clinical use. In: Fehmann,-H-C; Göke,-B (eds): The insulinotropic gut hormone glucagon-like peptide-1. Front Diabetes. Basel, Karger. 1997. Vol. 13, pp 219-233
- Byrne,-M-M; Gliem,-K; Wank,-U; Arnold,-R; Katschinski,-M; Polonsky,-K-S; Goke,-B** 1998 Glucagon-like peptide 1 improves the ability of the beta-cell to sense and respond to glucose in subjects with impaired glucose tolerance. Diabetes. 1998 Aug; 47(8):1259-65
- Campos,-R-V; Lee,-Y-C; Drucker,-D-J** 1994 Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in mouse. Endocrinology. 1994; 134:2156-2164
- Cao,-Y-J; Gimpl,-G; Fahrenholz,-F** 1995 The amino-terminal fragment of the adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptor functions as a high affinity PACAP binding domain. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1995; 212:673-80
- Carruthers,-C,-J,-L; Unson,-C,-G; Kim,-H,-N; Sakmar,-T,-P** 1994 Synthesis and expression of a gene for the rat glucagon receptor. The Journal of Biological Chemistry. 1994; 269(46):29321-28
- Chehade,-J-M; Mooradian,-A-D** 2000 A rational approach to drug therapy of type 2 diabetes mellitus. Drugs. 2000; 60:95-113
- Chen,-Y-E; Drucker,-D-J** 1997 Tissue-specific expression of unique mRNAs that encode proglucagon-derived peptides or exendin 4 in the lizard. The Journal of Biological Chemistry. 1997; 272:4108-4115
- Chicchi,-G-G; Graziano,-M-P; Koch,-G; Hey,-P; Sullivan,-K; Vicario,-P-P; Cascieri,-M-A** 1997 Alterations in receptor activation and divalent cation activation of agonist binding by deletion of intracellular domains of the glucagon receptor. The Journal of Biological Chemistry. 1997; 272:7765-69
- Chowen,-J-A; de-Fonseca,-F-R; Alvarez,-E; Navarro,-M; Garcia-Segura,-L-M; Blazquez,-E** 1999 Increased glucagon-like peptide-1 receptor expression in glia after mechanical lesion of the rat brain. Neuropeptides. 1999 Jun; 33(3):212-5
- Clain,-J-E; Malagelada,-J-R; Go,-V-L; Summerskill,-W-H** 1977 Participation of the jejunum and ileum in postprandial gastric secretion in man. Gastroenterology. 1977; 73:211-214

- Claustre,-J; Brechet,-S; Plaisancie,-P; Chayvialle,-J-A; Cuber,-J-C** 1999 Stimulatory effect of beta-adrenergic agonists on ileal L cell secretion and modulation by alpha-adrenergic activation. *J-Endocrinol.* 1999 Aug; 162(2):271-8
- Cleator,-I-G; Gourlay,-R-H** 1975 Release of immunoreactive gastric inhibitory polypeptide (IR-GIP) by oral ingestion of food substances. *The American Journal of Surgery.* 1975; 130:128-135
- Cohen,-D-P; Thaw,-C-N; Varma,-A; Gershengorn,-M-C; Nussenzweig,-D-R** 1997 Human calcitonin receptors exhibit agonist-independent (constitutive) signaling activity. *Endocrinology.* 1997; 138:1400-1405
- Conlon,-J-M; Samson,-W-K; Dobbs,-R-E; Orci,-L; Unger,-R-H** 1979 Glucagon-like polypeptides in canine brain. *Diabetes.* 1979; 28:700-702
- Cordier-Bussat,-M; Bernard,-C; Levenez,-F; Klages,-N; Laser-Ritz,-B; Philippe,-J; Chayvialle,-J-A; Cuber,-J-C** 1998 Peptones stimulate both the secretion of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 and the transcription of the proglucagon gene. *Diabetes.* 1998 Jul; 47(7):1038-45
- Crespel,-A; De-Boisvilliers,-F; Gros,-L; Kervran,-A** 1996 Effects of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on C cells from rat thyroid and medullary thyroid carcinoma CA-77 cell line. *Endocrinology.* 1996 Sep; 137(9):3674-80
- Creutzfeldt,-W** 1979 The incretin concept today. *Diabetologia.* 1979;16:75-85
- Creutzfeldt,-W; Ebert,-R** 1985 New developments in the incretin concept today. *Diabetologia.* 1985; 28:565-573
- Creutzfeldt,-W; Ebert-R** 1988 The incretin concept. *Advances of Metabolic Disorders.* 1988; 11:333-367
- Creutzfeldt,-W-O; Kleine,-N; Willms,-B; Orskov,-C; Holst,-J-J; Nauck,-M-A** 1996 Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care.* 1996 Jun; 19(6):580-6
- Cuche,-G; Cuber,-J-C; Malbert,-C-H** 2000 Ileal short-chain fatty acids inhibit gastric motility by a humoral pathway. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2000 Nov; 279(5):G925-30
- Cypess,-A-M; Unson,-C-G; Wu,-C-R; Sakmar,-T-P** 1999 Two cytoplasmic loops of the glucagon receptor are required to elevate cAMP or intracellular calcium. *The Journal of Biological Chemistry.* 1999; 274(27):19455-64
- Damholt,-A-B; Buchan,-A-M; Kofod,-H** 1998 Glucagon-like-peptide-1 secretion

from canine L-cells is increased by glucose-dependent-insulinotropic peptide but unaffected by glucose. *Endocrinology*. 1998 Apr; 139(4):2085-91

Damholt,-A-B; Kofod,-H; Buchan,-A-M 1999a Immunocytochemical evidence for a paracrine interaction between GIP and GLP-1-producing cells in canine small intestine. *Cell and Tissue Research*. 1999 Nov; 298(2): 287-93

Damholt,-A-B; Buchan,-A-M; Holst,-J-J; Kofod,-H 1999b Proglucagon processing profile in canine L cells expressing endogenous prohormone convertase 1/3 and prohormone convertase 2. *Endocrinology*. 1999 Oct; 140(10):4800-8

Davis,-H-R; Mullins,-D-E; Pines,-J-M; Hoos,-L-M; France,-C-F; Compton,-D-S; Graziano,-M-P; Sybertz,-E-J; Strader,-C-D; Van-Heek,-M 1998 Effect of chronic central administration of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on food consumption and body weight in normal and obese rats. *Obesity Research*. 1998 Mar; 6(2):147-56

Dawson,-J-M; Greathead,-H-M; Sessions,-V-A; Tye,-F-M; Buttery,-P-J 1999 Effect of gastric inhibitory polypeptide on bovine fat metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. Biochemistry and Molecular Biology*. 1999 May; 123(1):79-88

Deacon,-C-F; Pridal,-L; Klarskov,-L; Olesen,-M; Holst,-J-J 1996 Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig. *The American Journal of Physiology*. 1996; 271:E458-E464

Deacon,-C-F; Hughes,-T-E; Holst,-J-J 1998a Dipeptidyl peptidase IV inhibition potentiates the insulinotropic effect of glucagon-like peptide 1 in the anesthetized pig. *Diabetes*. 1998 May; 47(5):764-9

Deacon,-C-F; Knudsen,-L-B; Madsen,-K; Wiberg,-F-C; Jacobsen,-O; Holst,-J-J 1998b Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity. *Diabetologia*. 1998 Mar; 41(3):271-8

Degn,-K-B; Juhl,-C-B; Sturis,-J; Jakobsen,-G; Brock,-B; Chandromouli,-V; Rungby,-J; Landau,-B-R; Schmitz,-O 2004 One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivative Liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and α - and β -cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004; 53:1187-1194

Dhanvantari,-S; Seidah,-N-G; Brubaker,-P-L 1996 Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucagon. *Molecular Endocrinology*. 1996

Apr; 10(4): 342-55

- Dhanvantari,-S; Brubaker,-P-L** 1998 Proglucagon processing in an islet cell line: effects of PC1 overexpression and PC2 depletion. *Endocrinology*. 1998 Apr; 139(4):1630-7
- Dhanvantari,-S; Izzo,-A; Jansen,-E; Brubaker,-P-L** 2001 Coregulation of glucagon-like peptide-1 synthesis with proglucagon and prohormone convertase 1 gene expression in enteroendocrine GLUTag cells. *Endocrinology*. 2001 Jan; 142(1):37-42
- Dillon,-J-S; Tanizawa,-T; Wheeler,-M-B; Leng,-X-H; Ligon,-B-B; Rabin,-D-U; Warren,-H-Y; Permutt,-M-A; Boyd III,-A-E** 1993 Cloning and functional expression of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor. *Endocrinology*. 1993; 133:1907-1910
- Ding,-W-G; Renström,-E; Rorsman,-P; Buschard,-K; Gromada,-J** 1997 Glucagon-like peptide I and glucose dependent insulinotropic polypeptide stimulate Ca²⁺-induced secretion in rat α -cells by a protein kinase A-mediated mechanism. *Diabetes*. 1997; 46:792-800
- Di Paolo,-E; De Neef,-P; Moguilevsky,-N; Petry,-H; Bollen,-A; Waelbroeck,-M; Roberrecht,-P** 1998 Contribution of the second transmembrane helix of the secretin receptor to the positioning of secretin. *FEBS Lettters*. 1998; 424:207-10
- Dixon,-W; Wadia,-J-H** 1926 The action of intestinal extracts. *British Medical Journal*. 1926; 1:820
- Dormandy,-J-A; Charbonnel,-B; Eckland,-D-J et al. PROactive investigators** 2005 Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2005 Oct 8;366(9493):1279-89
- Dorn,-A; Rinne,-A; Berstein,-H-G; Ziegler,-M; Hahn,-H-J; Rasanen,-O** 1983 The glucagon/glucagon-like immunoreactivities in neurons of the human brain. *Experimental and Clinical Endocrinology*. 1983; 81:24-32
- The DREAM Trial investigators** 2006 Effect of ramipril on the incidence of diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2006; Sept. 15th, e-pub
- Drucker,-D-J; Mojsov,-S; Habener,-J-F** 1986 Cell-specific post-translational processing of proglucagon expressed from a metallothionine-glucagon fusion gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 1986; 261:9637-9643

- Drucker,-D-J; Asa,-S-L** 1988 Glucagon gene expression in vertebrate brain. *The Journal of Biological Chemistry*. 1988; 263:13475-13478
- Drucker,-D-J; Brubaker,-P-L** 1989 Proglucagon gene expression is regulated by a cyclic AMP-dependent pathway in rat intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1989; 86:3953-3957
- Drucker,-D-J; Jin,-T; Asa,-S-L; Young,-T-A; Brubaker,-P-L** 1994 Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Molecular Endocrinology*. 1994; 8:1646-1655
- Du,-K; Nicole,-P; Couvineau,-A; Laburthe,-M** 1997 Aspartate 196 in the first extracellular loop of the human VIP1 receptor is essential for VIP binding and VIP-stimulated cAMP production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997; 230:289-92
- Dumoulin,-V; Dakka,-T; Plaisancie,-P; Chayvialle,-J-A; Cuber,-J-C** 1995 Regulation of glucagon-like peptide-1-(7-36)amide, peptide YY, and neurotensin secretion by neurotransmitters and gut hormones in the isolated vascularly perfused rat ileum. *Endocrinology*. 1995; 136:5182-5188
- Dumoulin,-V; Moro,-F; Barcelo,-A; Dakka,-T; Cuber,-J-C** 1998 Peptide YY, glucagon-like peptide-1, and neurotensin responses to luminal factors in the isolated vascularly perfused rat ileum. *Endocrinology*. 1998 Sep; 1998; 139(9):3780-6
- Dupré,-J; Beck,-J-C** 1966 Stimulation of release of insulin by an extract of intestinal mucosa. *Diabetes*. 1996; 15:555-559
- Dupré,-J; Ross,-S-A; Watson,-D; Brown,-J-C** 1973 Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1973; 37:826-828
- Ebert,-R; Illmer,-K; Creutzfeldt,-W** 1979 Release of gastric inhibitory polypeptide (GIP) by intraduodenal acidification in rats and humans and abolishment of the incretin effect of acid by GIP-antiserum in rats. *Gastroenterology*. 1979; 76:515-523
- Ebert,-R; Creutzfeldt,-W** 1982 Influence of gastric inhibitory polypeptide antiserum on glucose-induced insulin secretion in rats. *Endocrinology*. 1982; 111:1601-1606
- Ebert,-R; Unger,-R-H; Creutzfeldt,-W** 1983 Preservation of incretin activity after removal of gastric inhibitory polypeptide (GIP) from rat gut extracts by immunoadsorption. *Diabetologia*. 1983; 24:449-454

- Edwards,-C-M; Abbott,-C-R; Sunter,-D; Kim,-M; Dakin,-C-L; Murphy,-K-G; Abusnana,-S; Taheri,-S; Rossi,-M; Bloom,-S-R** 2000 Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, glucagon-like peptide-1 and corticotrophin releasing factor inhibit feeding via agouti-related protein independent pathways in the rat. *Brain Research*. 2000 Jun 2; 866(1-2):128-34
- Edwards,-C-M; Todd,-J-F; Ghatel,-M-A; Bloom,-S-R** 1998 Subcutaneous glucagon-like peptide-1 (7-36) amide is insulinotropic and can cause hypoglycaemia in fasted healthy subjects. *Clinical Science*. 1998 Dec; 95(6):719-24
- Efrat,-S; Teitelman,-G; Anwar,-M; Ruggiero,-D; Hananhan,D** 1988 Glucagon gene regulatory region directs oncoprotein expression to neurons and pancreatic α -cells. *Neuron*. 1988; 1:605-613
- Eissele,-R; Göke,-R; Willemer,-S; Harthus,-H-P; Vermeer,-H; Arnold,-R; Göke,-B** 1992 Glucagon-like peptide-1(7-36)amide cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European Journal of Clinical Investigation*. 1992; 22:283-291
- Elahi,-D; Anderson,-D-K; Brown,-J-C; Debas,-H-T; Hershcopf,-R-J; Raizes,-G-S; Tobin,-J-D; Andres,-R** 1979 Pancreatic α -and β -cell responses to GIP infusion in normal man. *The American Journal of Physiology*. 1979; 237:E185-E191
- Elahi,-D; McAloon-Dyke,-M; Fukagawa,-N-K; Meneilly,-G-S; Sclater,-A-L; Minaker,-K-L; Haberner,-J-F; Andersen,-D-K** 1994 The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1(7-37) in normal and diabetic subjects. *Regulatory Peptides*. 1994; 51:63-74
- Elbrond,-B; Jakobsen,-G; Larsen,-S; Agerso,-H; Bjerring Jensen,-L; Rolan,-P; Stubis,-J; Hatorp,-V; Zdravkovic,-M** 2002 Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of a single-dose of NN2211, a long-acting glucagons-like peptide 1 derivative, in healthy male subjects. *Diabetes Care*. 2002; 25:1398-1404
- Elias,-C-F; Kelly,-J-F; Lee,-C-E; Ahima,-R-S; Drucker,-D-J; Saper,-C-B; Elmquist,-J-K** 2000 Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 2000 Jul 24; 423(2):261-81
- Elliot,-R-M; Morgan,-L-M; Tredger,-J-A; Deacon,-S; Wright,-J; Marks,-V** 1993 Glucagon-like peptide-1(7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide in response to nutrient ingestion in man: Acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *The Journal of Endocrinology*. 1993; 138:159-166

- Elrick,-H; Stimmler,-L; Hlad,-C-J; Arai,-Y** 1964 Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose administration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1964; 24:1076-1082
- Ensinck,-J-W; D'Alessio,-D-A** 1992 The entero-insular-axis revisited – a novel role for an incretin. *The New England of Medicine*. 1992; 326:1352-1353
- Falko,-J-M; Reynolds,-J-C; O'Dorisio,-T-M; Bosetti,-B; Cataland,-S** 1982 The role of gastric inhibitory polypeptide in the augmented insulin response to sucrose. *Diabetes Care*. 1982; 5:379-385
- Fehmann,-H-C; Habener,-J-F** 1991a Homologous desensitization of the insulinotropic glucagon-like peptide-I(7-37) receptor on insulinoma (HIT-T15) cells. *Endocrinology*. 1991; 128:2880-2888
- Fehmann,-H-C; Habener,-J-F** 1991b Functional receptors for the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37) on a somatostatin secreting cell line. *FEBS Letters*. 1991; 279:335-340
- Fehmann,-H-C; Habener,-J-F** 1992a Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in β TC-1 insulinoma cells. *Endocrinology*. 1992; 130:159-166
- Fehmann,-H-C; Göke,-R; Göke,-B** 1992b At the cutting edge: glucagon-like peptide 1 (7-37)/(7-36)amide is a new incretin hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1992; 85:C39-C44
- Fehmann,-H-C; Jiang,-J; Schweinfurth,-J; Dörsch,-K; Wheeler,-M-B; Boyd III,-A-E; Göke,-B** 1994 Ligand-specificity of the rat GLP-1 receptor recombinantly expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Zeitschrift für Gastroenterology*. 1994; 32:203-207
- Fehmann,-H-C; Göke,-R; Göke,-B** 1995 Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocrine Reviews*. 1995; 16:390-410
- Fehmann,-H-C; Jiang,-J; Pitt,-D; Schweinfurth,-J; Göke,-B** 1996a Ligand-induced regulation of glucagon-like peptide-I receptor function and expression in insulin-secreting beta cells. *Pancreas*. 1996 Oct; 13(3):273-82
- Fehmann,-H-C; Schweinfurth,-J; Jiang,-J; Göke,-B** 1996b Regulation of glucagon-like peptide-I receptor expression and transcription by the protein kinase C pathway. *Research in Experimental Medicine*. 1996; 196(4):219-25
- Fehmann,-H-C; Göke,-B (eds)** 1997 The insulinotropic gut hormone glucagon-like

peptide-1. *Frontiers in Diabetes*. Karger. Basel. 1997. vol 13

- Ferraris,-R-P; Yasharpour,-S; Lloyd,-K-C-K; Mirzayan,-R; Diamond,-J-M** 1990 Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *The American Journal of Physiology*. 1990; 259:G822-G837
- Findlay,-D-M; Houssami,S; Lin,-H-Y; Myers,-D-E; Brady,-C-L; Darcy,-P-K; Ikeda,-K; Martin,-T-J; Sexton,-P-M** 1994 Truncation of the porcine calcitonin receptor cytoplasmic tail inhibits internalization and signal transduction but increases receptor affinity. *Molecular Endocrinology*. 1994; 8:1691-1700
- Flint,-A; Raben,-A; Rehfeld,-J-F; Holst,-J-J; Astrup,-A** 2000 The effect of glucagon-like peptide-1 on energy expenditure and substrate metabolism in humans. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 2000 Mar; 24(3):288-98
- Flint,-A; Raben,-A; Astrup,-A; Holst,-J-J** 1998 Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998 Feb 1; 101(3):515-20
- Freyse,-E-J; Becher,-T; El-Hag,-O; Knospe,-S; Goke,-B; Fischer,-U** 1997 Blood glucose lowering and glucagonostatic effects of glucagon-like peptide I in insulin-deprived diabetic dogs. *Diabetes*. 1997 May; 46(5):824-8
- Freyse,-E-J; Knospe,-S; Becher,-T; El-Hag,-O; Goke,-B; Fischer,-U** 1999 Glucagon-like peptide-1 has no insulin-like effects in insulin-dependent diabetic dogs maintained normoglycemic and normoinsulinemic. *Metabolism*. 1999 Jan; 48(1):134-7
- Fürstenau,-U; Schaninger,-M; Blume,-R; Kennerknecht,-Z; Knepel,-W** 1997 Characterization of a novel protein kinase C response element in the glucagon gene. *Molecular Cellular Biology*. 1997; 17:1805-1816
- Furuta,-M; Yano,-H; Zhou,-A; Rouille,-Y; Holst,-J-J; Carroll,-R; Ravazzola,-M; Orci,-L; Futura,-H; Steiner,-D-F** 1997 Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1997; 94:6646-6651
- Gajic,-D; Drucker,-D-J** 1993 Multiple cis-acting domains mediate basal and adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent glucagon gene transcription in a mouse neuroendocrine cell line. *Endocrinology*. 1993; 123:1055-1062
- Gale,-E-A** 2001 Lessons from the glitazones: a story of drug development. *Lancet*. 2001; 357:1870-5

- Galehshahi,-F-S; Goke,-B; Lankat-Buttgereit,-B** 1998 Contribution of a PS1-like element to the tissue- and cell-specific expression of the human GLP-1 receptor gene. *FEBS Letters*. 1998 Oct 2; 436(2):163-8
- Galehshahi,-F-S; Goke,-B; Lankat-Buttgereit,-B** 2000 A novel silencer element repressing expression of the GLP-1 receptor gene in fibroblasts and pancreatic A-cells, but not in pancreatic B- and D-cells. *Peptides*. 2000 Aug; 21(8):1169-76
- Galera,-C; Clemente,-F; Alcantara,-A; Trapote,-M-A; Perea,-A; Lopez-Delgado,-M-I; Villanueva-Penacarrillo,-M-L; Valverde,-I** 1996 Inositolphosphoglycans and diacylglycerol are possible mediators in the glycogenic effect of GLP-1(7-36)amide in BC3H-1 myocytes. *Cell Biochemistry and Function*. 1996 Mar; 14(1):43-8
- Gallwitz,-B; Schmidt,-W-E; Conlon,-J-M; Creutzfeldt,-W** 1990 Glucagon-like peptide-1(7-36)amide: characterization of the domain responsible for binding to its receptor on rat insulinoma RINm5F cells. *Journal of Molecular Endocrinology*. 1990; 5:33-39
- Gallwitz,-B; Witt,-M; Morys-Wortmann,-C; Folsch,-U-R; Schmidt,-W-E** 1996 GLP-1/GIP chimeric peptides define the structural requirements for specific ligand-receptor interaction of GLP-1. *Regulatory Peptides*. 1996 May 7; 63(1):17-22
- Gallwitz,-B; Ropeter,-T; Morys-Wortmann,-C; Mentlein,-R; Siegel,-E-G; Schmidt,-W-E** 2000 GLP-1-analogues resistant to degradation by dipeptidyl-peptidase IV in vitro. *Regulatory Peptides*. 2000 Jan 29; 86(1-3): 103-11
- Ganda,-O-P; Soeldner,-O-S; Gleason,-R-E; Cleator,-J-G-M; Reynolds,-C** 1979 Metabolic effects of glucose, mannose, galactose and fructose in man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1979; 49:616-622
- Garcia-Flores,-M; Zuco,-J-A; Alvarez,-E; Blazquez,-E** 2001 Expression of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor and the effect of GLP-1-(7-36) amide on insulin release by pancreatic islets during rat ontogenic development. *The European Journal of Biochemistry*. 2001 Feb; 268(3):514-20
- Garcia-Martinez,-J-A; Cancelas,-J; Villanueva-Penacarrillo,-M-L; Valverde,-I; Malaisse,-W-J** 2000 Prolongation of the insulinotropic action of glucagon-like peptide 1 by the dimethyl ester of succinic acid in an animal model of type-2 diabetes. *International Journal of Molecular Medicine*. 2000 Sep; 6(3):319-21
- Gaudin,-P; Maoret,-J-J; Couvineau,-A; Rouyer-Fessard,-C; Laburthe,-M** 1998 Constitutive activation of the human vasoactive intestinal peptide 1 receptor, a

member of the new class II family of G protein-coupled receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273:4990-96

Gelling,-R-W; Wheeler,-M-B; Xue,-J; Gyomory,-S; Nian,-C; Pederson,-R-A;

McIntosh,-C-H 1997 Localization of the domains involved in ligand binding and activation of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. *Endocrinology*. 1997; 138:2640-43

Gerich,-J-E 1989 Oral hypoglycemic agents. *The New England Journal of Medicine*. 1989;321:1231-1245

Ghiglione,-M; Uttenthal,-L-O; George,-S-K; Bloom,-S-R 1984 How glucagon-like is glucagon-like peptide-1? *Diabetologia*. 1984; 27:599-600

Göke,-B (ed) 1993 Abstracts of the international symposium on glucagon-like peptide-1. Digestion. 1993; 54:337-397

Göke,-R; Conlon,-J-M 1988a Receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat insulinoma-derived cells. *The Journal of Endocrinology*. 1988; 116:357-362

Göke,-R; Göke,-B; Richter,-G; Arnold-R 1988b Entero-insulinäre Achse: der neue Inretinkandidat Glucagon-like Peptid-1 (7-36) amid (GLP-1(7-36)amid). *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 1988; 26:715-719

Göke,-R; Cole,-T; Conlon,-J-M 1989a Characterization of the receptor for glucagon-like peptide-I(7-36)amide on plasma membranes from rat insulinoma-derived cells by covalent cross-linking. *The Journal of Molecular Endocrinology*. 1989; 2:93-98

Göke,-R; Fehmann,-H-C; Richter,-G; Trautmann,-M; Göke,-B 1989b Interaction of glucagon-like peptide-1(7-36)amide and somatostatin-14 in RINm5F cells and in the perfused rat pancreas. *Pancreas*.1989; 4:668-673

Göke,-R; Richter,-G; Göke,-B; Trautmann,-M; Arnold,-R 1989c Internalization of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in rat insulinoma cells. *Research in Experimental Medicine*. 1989; 189:257-264

Göke,-R; Fehmann,-H,-C; Göke,-B 1991 Glucagon-like peptide 1 (7-36)amide is a new incretin/enterogastrone candidate. *The European Journal of Clinical Investigation*. 1991; 21:135-144

Göke,-R; Oltmer,-B; Sheikh,-S; Göke,-B 1992 Solubilization of active GLP-1 (7-36)amide receptors from RINm5F plasma membranes. *FEBS Letters*. 1992; 300:232-236

Göke,-R; Fehmann,-H-C; Linn,-T; Schmidt,-H; Krause,-M; Eng,-J; Göke,-B 1993a Exendin-4 is a high-potency agonist and truncated exendin (9-39)amide an

- antagonist at the GLP-1(7-36)amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268:19650-19655
- Göke,-R; Wagner,-B; Fehmman,-H-C; Göke,-B** 1993b Glucose-dependency of the insulin stimulatory effect of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on the rat pancreas. *Research in Experimental Medicine*. 1993; 193:97-103
- Göke,-R; Just,-R; Lankat-Buttgereit,-B; Göke,-B** 1994 Glycosylation of the GLP-1 receptor is a prerequisite for regular receptor function. *Peptides*. 1994; 15:675-681
- Göke,-R; Larsen,-P-J; Mikkelsen,-J-D; Sheikh,-S-P** 1995 Identification of specific binding sites for glucagon-like peptide-1 on the posterior lobe of the rat pituitary. *Neuroendocrinology*. 1995; 62:130-134
- Goldberg,-N-J; Wingert,-T-D; Levin,-S-R; Adachi,-R-I** 1980 Augmentation of insulin secretion in man by a non-nutrient drink. *Gastroenterology*. 1980; 78:1458-1462
- Goldstone,-A-P; Morgan,-I; Mercer,-J-G; Morgan,-D-G; Moar,-K-M; Ghatei,-M-A; Bloom,-S-R** 2000 Effect of leptin on hypothalamic GLP-1 peptide and brain-stem pre-proglucagon mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000 Mar 16; 269(2):331-5
- Goldstone,-A-P; Mercer,-J-G; Gunn,-I; Moar,-K-M; Edwards,-C-M; Rossi,-M; Howard,-J-K; Rasheed,-S; Turton,-M-D; Small,-C; Heath,-M-M; O'Shea,-D; Steere,-J; Meeran,-K; Ghatei,-M-A; Hoggard,-N; Bloom,-S-R** 1997 Leptin interacts with glucagon-like peptide-1 neurons to reduce food intake and body weight in rodents. *FEBS-Letters*. 1997 Sep 29; 415(2):134-8
- Gray,-G-M** 1975 Carbohydrate digestion absorption: role of the small intestine. *The New England Journal of Medicine*. 1975; 292:1225-1230
- Graziano,-M-P; Hey,-P-J; Strader,-C-D** 1996 The amino terminal domain of the glucagon-like peptide-1 receptor is a critical determinant of subtype specificity. *Receptors and Channels*. 1996; 4(1):9-17
- Greenberg,-G-R** 1987 Influence of vagal integrity on gastrin and somatostatin release in dogs. *Gastroenterology*. 1987; 93:994-1001
- Grimelius,-L; Capella,-C; Buffa,-R; Polak,-J-M; Pearse,-A-G-E; Solcia,-E** 1976 Cytochemical and ultrastructural differentiation of enteroglucagon and pancreatic-type glucagon cells of the gastrointestinal tract. *Virchows Archiv*. 1976; 20:217-228
- Gromada,-J; Dissing,-S; Rorsman,-P** 1996 Desensitization of glucagon-like peptide

- 1 receptors in insulin-secreting beta TC3 cells: role of PKA-independent mechanisms. *British Journal of Pharmacology*. 1996 Jun; 118(3):769-75
- Gromada,-J; Ding,-W-G; Barg,-S; Renstrom,-E; Rorsman,-P** 1997 Multisite regulation of insulin secretion by cAMP-increasing agonists: evidence that glucagon-like peptide 1 and glucagon act via distinct receptors. *Pflugers Archiv*. 1997 Sep; 434(5):515-24
- Gromada,-J; Bokvist,-K; Ding,-W-G; Holst,-J-J; Nielsen,-J-H; Rorsman,-P** 1998a Glucagon-like peptide 1 (7-36) amide stimulates exocytosis in human pancreatic beta-cells by both proximal and distal regulatory steps in stimulus-secretion coupling. *Diabetes*. 1998 Jan; 47(1):57-65
- Gromada,-J; Anker,-C; Bokvist,-K; Knudsen,-L-B; Wahl,-P** 1998b Glucagon-like peptide-1 receptor expression in *Xenopus* oocytes stimulates inositol trisphosphate-dependent intracellular Ca²⁺ mobilization. *FEBS-Letters*. 1998 Mar 27; 425(2):277-80
- Groop,-L-C; Perlkonen,-R; Koskimies,-S; et al.** 1986 Secondary failure to treatment with oral antidiabetic agents in non-insulin dependent diabetes. *Diabetes Care*. 1986; 9:129-33
- Gutniak,-M; Orskov,-C; Holst,-J-J; Ahren,-B; Efendic,-S** 1992 Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*. 1992; 326:1316-1322
- Gutniak,-M-K; Linde,-B; Holst,-J-J; Efendic,-S** 1994 Subcutaneous injection of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 abolishes postprandial glycemia in NIDDM. *Diabetes Care*. 1994; 17:1039-1044
- Gutniak,-M-K; Juntti-Berggren,-L; Hellstrom,-P-M; Guenifi,-A; Holst,-J-J; Efendic,-S** 1996 Glucagon-like peptide I enhances the insulinotropic effect of glibenclamide in NIDDM patients and in the perfused rat pancreas. *Diabetes-Care*. 1996 Aug; 19(8):857-63
- Gutniak,-M-K; Larsson,-H; Sanders,-S-W; Juneskans,-O; Holst,-J-J; Ahren,-B** 1997 GLP-1 tablet in type 2 diabetes in fasting and postprandial conditions. *Diabetes-Care*. 1997 Dec; 20(12):1874-9
- Gutzwiller,-J-P; Goke,-B; Drewe,-J; Hildebrand,-P; Ketterer,-S; Handschin,-D; Winterhalder,-R; Conen,-D; Beglinger,-C** 1999 Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut*. 1999 Jan; 44(1):81-6
- Habener,-J-F; Goodman,-R-H; Lund,-P-K** 1985 Complementary DNAs encoding

precursors of glucagon and somatostatin. In: Hakanson,-R; Thorell,-J
(Herausgeber) Bioenergetics of Neurohormonal Peptides. Academic Press,
London. 1985.47-61

Habener,-J-F 1996 Insulinotropic glucagon-like peptides. In: LeRoith,-D; Taylor,-S-I;
Olefsky,-J-M (eds). Diabetes Mellitus. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1996. pp
68-78

Habener,-J-F 1997 Proglucagon gene structure and regulation of expression. In:
Fehmann,-H-C; Göke,-B (eds) The Insulinotropic Gut Hormone Glucagon-like
Peptide-1. Karger, Basel. 1997. Vol. 13:15-23

Hallbrink,-M; Hilmquist,-T; Olsson,-M; Ostenson,-C-G; Efendic,-S; Langel,-U
2001 Different domains in the third intracellular loop of the GLP-1 receptor are
responsible for Galpha(s) and Galpha(i)/Galpha(o) activation. *Biochimica et*
Biophysica Acta. 2001; 1546:79-86

Han,-V-K-M; Hynes,-M-A; Jin,-C; Towle,-A-C; Landauer,-J-M; Lund,-P-K 1986
Cellular localization of proglucagon/glucagon-like peptide I messenger RNAs in
rat brain. *Journal of Neuroscience Research*. 1986; 16:97-107

Hansen,-B-F; Jensen,-P; Nepper-Christensen,-E; Skjolstrup,-B 1998 Effects of
glucagon-like peptide-1 (7-36)amide on insulin stimulated rat skeletal muscle
glucose transport. *Acta Diabetologica*. 1998 Jul; 35(2):101-3

Hansen,-L; Deacon,-C-F; Orskov,-C; Holst,-J-J 1999 Glucagon-like peptide-1-(7-
36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl
peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine.
Endocrinology. 1999 Nov; 140(11):5356-63

Hansen,-L; Hartmann,-B; Bisgaard,-T; Mineo,-H; Jorgensen,-P-N; Holst,-J-J
2000 Somatostatin restrains the secretion of glucagon-like peptide-1 and -2 from
Isolated perfused porcine ileum. *American Journal of Physiology, Endocrinology*
and Metabolism. 2000 Jun; 278(6):E1010-8

Hareter,-A; Hoffmann,-E; Bode,-H-P; Goke,-B; Goke,-R 1997 The positive charge
of the imidazole side chain of histidine7 is crucial for GLP-1 action. *Endocrine*
Journal. 1997 Oct; 44(5):701-5

Harris,-M-I; Flegal,-K-M; Cowie,-C-C; et al. 1998 Prevalence of diabetes, impaired
fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults: the third national
health and nutrition examination survey, 1988-1994. *Diabetes Care*. 1998; 21:518-
24

- Hasegawa,-S; Terazono,-K; Nata,-K; Takada,-T; Yamamoto,-H; Okamoto,-H** 1990 Nucleotide sequence determination of chicken glucagon precursor cDNA: chicken preproglucagon does not contain glucagon-like peptide II. *FEBS Letters*. 1990; 264:117-120
- Hassan,-M; Eskilsson,-A; Nilsson,-C; Jonsson,-C; Jacobsson,-H; Refai,-E; Larsson,-S; Efendic,-S** 1999 In vivo dynamic distribution of ¹³¹I-glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in the rat studied by gamma camera. *Nuclear Medicine and Biology*. 1999 May; 26(4):413-20
- Heinrich,-G; Gros,-P; Lund,-P-K; Bentley,-R-C; Habener,-J-F** 1984 Pre-proglucagon messenger ribonucleic acid: nucleotide and encoded amino acid sequences of the rat pancreatic complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*. 1984; 115:2176-2181
- Heller,-H** 1929 Über den blutzuckerwirksamen Stoff in Sekretinextrakten. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*. 1929; 145:343-358
- Heller,-H** 1935 Über das insulinotrope Hormon der Darmschleimhaut (Duodenin). *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*. 1935; 177:127-133
- Heller,-R-S; Aponte,-G-W** 1995 Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-like peptide-1(7-36)amide. *The American Journal of Physiology*. 1995; 269:G853-G860
- Heller,-R-S; Kieffer,-T-J; Habener,-J-F** 1996 Point mutations in the first and third intracellular loops of the glucagon-like peptide-1 receptor alter intracellular signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996 Jun 25; 223(3): 624-32
- Heller,-R-S; Kieffer,-T-J; Habener,-J-F** 1997 Insulinotropic glucagon-like peptide 1 receptor expression in glucagon-producing α -cells of the rat endocrine pancreas. *Diabetes*. 1997; 46:785-791
- Herrmann,-C; Göke,-R; Richter,-G; Fehmann,-H-C; Arnold,-R; Göke,-B** 1995 Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin releasing polypeptide secretion in response to nutrients. *Digestion*. 1995; 56:117-126
- Herrmann-Rinke,-C; Hörsch,-D; McGregor,-G-P; Göke,-B** 1996 Galanin is a potent inhibitor of glucagon-like peptide-1 secretion from rat ileum. *Peptides*. 1996; 17(4):571-6
- Higuchi,-R** 1990 Recombinant PCR. *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc. London. 1990

- Hill,-M-E; Asa,-S-L; Drucker,-D-J** 1999 Essential requirement for Pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription. *Molecular Endocrinology*. 1999 Sep; 13(9):1474-86
- Hjorth,-S-A; Adelhorst,-K; Pedersen,-B-B; Kirk,-O; Schwartz,-T-W** 1994 Glucagon and glucagon-like peptide 1: selective receptor recognition via distinct peptide epitopes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269:30121-24
- Hjorth,-S-A; Orskov,-C; Schwartz,-T-W** 1998 Constitutive activity of glucagon receptor mutants. *Molecular Endocrinology*. 1998; 12:78-86
- Holeman,-R-R; Cull,-C-A; Turner,-R-C on behalf of the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group** 1999 A randomized double-blind trial of acarbose in type 2 diabetes shows improved glycemic control over 3 years (UKPDS 44). *Diabetes Care*. 1999; 22:960-4
- Holst,-J-J; Orskov,-C; Van Nielsen,-O; Schwartz,-T-W** 1987 Truncated glucagon-like peptide I, an insulin-releasing hormone from the distal gut. *FEBS Letters*. 1987;211:169-173
- Holst,-J-J; Bersani,-M; Johnsen,-A-H; Kofod,-H; Hartmann,-B; Orskov,-C** 1994 Proglucagon processing in porcine and human pancreas. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269:18827-18833
- Holst,-J-J; Deacon,-C-F** 1998 Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes*. 1998 Nov; 47(11):1663-70
- Holtmann,-M-H; Hadac,-E-M; Miller,-L-J** 1995 Critical contributions of amino-terminal extracellular domains in agonist binding and activation of secretin and vasoactive intestinal polypeptide receptors. *Studies of chimeric receptors. The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270:14394-98
- Holtmann,-M-H; Ganguli,-S; Hadac,-E-M; Dolu,-V; Miller,-L-J** 1996 Multiple extracellular loop domains contribute critical determinants for agonist binding and activation of the secretin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271:14944-49
- Holz,-G-G; Kühtreiber,-W-M; Habener,-J-F** 1993 Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37). *Nature*. 1993; 361:362-365
- Holz,-G-G; Leech,-C-A; Heller,-R-S; Castonguay,-M; Habener,-J-F** 1999 cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca²⁺ stores by activation of ryanodine receptors in pancreatic beta-cells. A Ca²⁺ signaling system stimulated by the

insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37). *The Journal of Biological Chemistry*. 1999 May 14; 274(20): 14147-56

- Horn,-F; Vriend,-G; Cohen,-F-E** 2001 Collecting and Harvesting Biological Data: The GPCRDB & NucleaRDB Databases. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29:346-349
- Huang,-Z; Chen,-Y; Nissenson,-R-A** 1995 The cytoplasmic tail of the G-protein-coupled receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein contains positive and negative signals for endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270:151-56
- Huang,-Z; Chen,-Y; Pratt,-S; Chen,-T-H; Bambino,-T; Nissenson,-R-A; Shoback,-D-M** 1996 The N-terminal region of the third intracellular loop of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is critical for coupling to cAMP and inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271:33382-89
- Hughes,-T-A; Gwyne,-J-T; Switzer,-B-R; et al.** 1984 Effects of caloric restriction and weight loss on glycemic control, insulin release and resistance, and atherosclerotic risk in obese patients with type II diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine*. 1984; 77:7-17
- Hui,-H; Wright,-C; Perfetti,-R** 2001 Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes*. 2001 Apr; 50(4):785-96
- Hui,-H; Zhao,-X; Perfetti,-R** 2005 Structure and function studies of glucagons-like peptide-1 (GLP-1): the designing of a novel pharmacological agent for the treatment of diabetes. *Diabetes, Metabolism Research and Reviews*. 2005; 21:313-31
- Hupe-Sodmann,-K; McGregor,-G-P; Bridenbaugh,-R; Göke,-R; Göke,-B; Thole,-H; Zimmermann,-B; Voigt,-K** 1995 Characterization of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7-36)amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides. *Regulatory Peptides*. 1995;58:149-156
- Hupe-Sodmann,-K; Goke,-R; Goke,-B; Thole,-H-H; Zimmermann,-B; Voigt,-K; McGregor,-G-P** 1997 Endoproteolysis of glucagon-like peptide (GLP)-1 (7-36) amide by ectopeptidases in RINm5F cells. *Peptides*. 1997; 18(5):625-32
- Hussain,-M-A; Habener,-J-F** 1999 Glucagon gene transcription activation mediated

by synergistic interactions of pax-6 and cdx-2 with the p300 co-activator. The Journal of Biological Chemistry. 1999; 274:28950-28957

Hussain,-M-A; Habener,-J-F 2000 Glucagon-like peptide 1 increases glucose-dependent activity of the homeoprotein IDX-1 transactivating domain in pancreatic beta-cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2000 Aug 11; 274(3):616-9

Ibelgaufits,-H 1990 Gentechnologie von A bis Z. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim. 1990

Iida-Klein,-A; Guo,-J; Takemura,-M; Drake,-M-T; Potts,-J-T,jr.; Abou-Samra,-A; Bringhamst,-F-R; Segre,-G-V 1997 Mutations in the second cytoplasmic loop of the rat parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor result in selective loss of PTH-stimulated phospholipase C activity. The Journal of Biological Chemistry. 1997; 272:6882-89

Imeryuz,-N; Yegen,-B-C; Bozkurt,-A; Coskun,-T; Villanueva-Penacarrillo,-M-L; Ulusoy,-N-B 1997 Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. The American Journal of Physiology. 1997 Oct; 273(4 Pt 1):G920-7

Inokuchi,-A; Tomida,-Y; Yanaihara,-C; Yui,-R; Oomura,-Y; Kimura,-H; Hase,-T; Matsumoto,-T 1986 Glucagon-related peptides in the rat hypothalamus. Cell and Tissue Research. 1986; 246:71-75

Iritani,-N; Sugimoto,-T; Fukuda,-H; Komiya,-M; Ikeda,-H 1999 Oral triacylglycerols regulate plasma glucagon-like peptide-1(7-36) and insulin levels in normal and especially in obese rats. The Journal of Nutrition. 1999 Jan; 129(1):46-50

Irwin,-D-M; Wong,-J 1995 Trout and chicken proglucagon: alternative splicing generates mRNA transcripts encoding glucagon-like peptide 2. Molecular Endocrinology. 1995 9:267-277

Irwin,-D-M; Satkunarajah,-M; Wen,-Y; Brubaker,-P-L; Pederson,-R-A; Wheeler,-M-B 1997 The Xenopus proglucagon gene encodes novel GLP-1-like peptides with insulinotropic properties. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1997; 94:7915-7920

Ishihara,-T; Nakamura,-S; Kaziro,-Y 1991 Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. The EMBO Journal. 1991; 10:1635-1641

Ishihara,-T; Shigemoto,-R; Mori,-K; Takahashi,-K; Nagata,-S 1992 Functional

expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *Neuron*. 1992; 8:811-819

- Iwanij,-V, Hur,-K,-C** 1985 Direct cross-linking of ¹²⁵I-labeled glucagon to its membrane receptor by UV irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1985; 82:325-29
- Iyengar,-R; Herberg,-J,-T** 1984 Structural analysis of the hepatic glucagon receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1984; 259:5222-29
- Jelinek,-L-J; Lok,-S; Rosenberg,-G-B** 1993 Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science*. 1993; 259:1614-1616
- Jin,-S-L; Han,-V-K-M; Simmons,-J-G; Towle,-A-C; Lund,-P-K** 1988 Distribution of glucagon-like peptide I (GLP-1) glucagon, and glicentin in the rat brain. An immunohistochemical study. *The Journal of Comparative Neurology*. 1988; 271:519-532
- Jin,-T; Drucker,-D-J** 1995 The proglucagon gene upstream enhancer contains positive and negative domains important for tissue-specific proglucagon gene transcription. *Molecular Endocrinology*. 1995 9:1306-1320
- Jonathan,-C-J; Yen-Pin,-C** 1995 Chap. 30 In: *Diabetes in America*. 2nd ed. Washington (DC). National Institute of Health. NIH Publication no.: 95-1468.
- 1995 Joseph,-J-W; Kalitsky,-J; St-Pierre,-S; Brubaker,-P-L 2000 Oral delivery of glucagon-like peptide-1 in a modified polymer preparation normalizes basal glycaemia in diabetic db/db mice. *Diabetologia*. 2000 Oct; 43(10):1319-28
- Jüppner,-H; Abou-Samra,-A-B; Freeman,-M** 1991 A G-protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone related peptide. *Science*. 1991; 254:1024-1026
- Jüppner,-H; Schipani,-E; Bringham,-F-R; McClure,-I; Keutmann,-H-T; Potts,-J-T,Jr; Kronenberg,-H-M; Abou-Samra,-A-B; Segre,-G-V; Gardella,-T-J** 1994 The extracellular amino-terminal region of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor determines the binding affinity for carboxyl-terminal fragments of PTH-(1-34). *Endocrinology*. 1994; 134:879-84
- Juntti-Berggren,-L; Pigon,-J; Karpe,-F; Hamsten,-A; Gutniak,-M; Vignati,-L; Efendic,-S** 1996 The antidiabetogenic effect of GLP-1 is maintained during a 7-day treatment period and improves diabetic dyslipoproteinemia in NIDDM patients. *Diabetes Care*. 1996 Nov; 19(11):1200-6
- Kanse,-S-M; Kreyman,-B; Ghatei,-M-A; Bloom,-S-R** 1988 Identification and

characterization of glucagon-like peptide-1 7-36 amide-binding sites in the rat brain and lung. *FEBS Letters*. 1988; 241:209-212

Kato,-M; Ma,-H-T; Tatemoto,-K 1996 GLP-1 depolarizes the rat pancreatic beta cell in a Na(+)-dependent manner. *Regulatory Peptides*. 1996 Apr 9; 62(1):23-7

Kauth,-T; Metz,-J 1987 Immunohistochemical localization of glucagon-like peptide-1: use of poly- and monoclonal antibodies. *Histochemistry*. 1987; 86:509-515

Kawai,-K; Suzuki,-S; Ohashi,-S 1989 Comparison of the effects of glucagon-like peptide-I(1-37) and (7-37) and glucagon on islet hormone release from isolated perfused canine and rat pancreas. *Endocrinology*. 1989; 124:1768-1773

Kawai,-K; Watanabe,-Y; Suzuki,-S; Ohashi,-S; Mukai,-H; Yamashita,-T 1991 Antagonists of glucagon-like peptide-1; structure-activity study for the insulinotropic activity. *Diabetes*. 1991; 40:71A (abstract)

Kieffer,-T-J; Buchan,-A-M; Barker,-H; Brown,-J-C; Pederson,-R-A 1994 Release of gastric inhibitory polypeptide from cultured canine endocrine cell line. *The American Journal of Physiology*. 1994; 267:E489-E496

Kieffer,-T-J; Huang,-Z; McIntosh,-C-H; Buchan,-A-M; Brown,-J-C; Pederson,-R-A 1995a Gastric inhibitory polypeptide release from a tumorderived cell line. *The American Journal of Physiology*. 1995; 269:E316-E322

Kieffer,-T-J; McIntosh,-C-H-S; Pederson,-R-A 1995b Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*. 1995; 136:3585-3596

Kieffer,-T-J; Heller,-R-S; Unson,-C-G; Weir,-G-C; Habener,-J-F 1996 Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology*. 1996 Nov; 137(11):5119-25

Kieffer,-T-J; Habener,-J-F 1999 The glucagon-like peptides. *Endocrine Reviews*. 1999; 20:876-913

Kim,-J-G; Baggio,-L-L; Bridon,-D-P; Castaigne,-J-P; Robitaille,-M-F; Jetté,-L; Benquet,-C; Drucker,-D-J 2003 Development and characterization of a glucagons-like peptide 1-albumin conjugate. The ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor in vivo. *Diabetes*. 52:751-759

Kim-Y; Rose,-C-A 1995 Precipitation of insulinotropinin the presence of protamine: Effect of phenol and zinc on the isophane ratio and the insulinotropin concentration in the supernatant. *Pharmaceutical Research*. 12:1284-88

Knapper,-J-M-E; Heath,-A; Fletcher,-J-M; Morgan,-L-M; Marks,-V 1995 GIP

- and GLP-1(7-36)amide secretion in response to intraduodenal infusion of nutrients in pigs. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1995; 111C:445-450
- Knepel,-W; Chafitz,-J; Habener,-J-F** 1990 Transcriptional activation of the rat glucagon gene by the cAMP-response element in pancreatic islet cells. *Molecular Cell Biology*. 1990 10:6799-6804
- Knudsen,-L-B; Pridal,-L** 1996 Glucagon-like peptide-1-(9-36) amide is a major metabolite of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide after in vivo administration to dogs, and it acts as an antagonist on the pancreatic receptor. *The European Journal of Pharmacology*. 1996 Dec 30; 318(2-3):429-35
- Knudsen,-L-B; Nielsen,-P-F; Huusfeldt,-P-O; Johansen,-N-L; Madsen,-K; Pedersen,-F-Z; Thogersen,-H; Wilken,-M; Agerso,-H** 2000 Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2000 May 4; 43(9):1664-9
- Kolligs,-F; Fehmman,-H-C; Göke,-R; Göke,-B** 1995 Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide 1 receptor antagonist exendin(9-39)amide. *Diabetes*. 1995; 44:16-19
- Kosaka,-T; Lim,-R-K-S** 1930 Demonstration of the humoral agent in fat inhibition of gastric secretion. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. 1930 27:890-891
- Kreymann,-B; Ghatei,-M-A; Williams,-G; Bloom,-S-R** 1987 Glucagon-like peptide-1(7-36): a physiological incretin in man. *Lancet*. 1987; 2:1300-1304
- Kreymann,-B; Yiangou,-Y; Kanse,-S; Williams,-G; Ghatei,-M-A; Bloom,-S-R** 1988 Isolation and characterization of GLP-1(7-36)amide from rat intestine. *FEBS Letters*. 1988; 242:167-170
- Kreymann,-B; Ghatei,-M-A; Burnet,-P Williams,-G; Kanse,-S; Diani,-A-R; Bloom,-S-R** 1989 Characterization of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in the hypothalamus. *Brain Research*. 1989; 502:325-331
- Kuzio,-M; Dryburgh,-J-R; Malloy,-K-M; Brown,-J-C** 1974 Radioimmunoassay for gastric inhibitory polypeptide. *Gastroenterology*. 1974; 66:357-364
- LaBarre,-J; Still,-E-U** 1930 Studies on the physiology of secretin. III. Further studies on the effects of secretin on the blood sugar. *The American Journal of Physiology*. 1930; 91:649-653
- LaBarre,-J** 1932 Sur les possibilites d'un traitement du diabete oar l'incetine. *Bulletin de l'Academie Royale de Medecine de Belgique*. 1932; 12:620-634

- Lamari,-Y; Boissard,-C; Moukhtar,-M-S; Jullienne,-A; Rosselin,-G; Garel,-J-M** 1996 Expression of glucagon-like peptide 1 receptor in a murine C cell line: regulation of calcitonin gene by glucagon-like peptide 1. *FEBS-Letters*. 1996 Sep 16; 393(2-3):248-52
- Lane,-M-A** 1907 The cytological characters of the areas of Langerhans. *The American Journal of Anatomy*. 1907; 7:409-422
- Lankat-Buttgereit,-B; Göke,-R; Stöckmann,-F; Fehmann,-H-C; Göke-B** 1994 Detection of the human GLP-1(7-36)amide receptor on insulinoma-derived cell membranes. *Digestion*. 1994; 55:29-33
- Lankat-Buttgereit,-B; Göke,-R; Fehmann,-H-C; Richter,-G; Göke,-B** 1994 Molecular cloning of a cDNA encoding for the GLP-1 receptor expressed in rat lung. *Experimental and Clinical Endocrinology*. 1994; 102:341-347
- Lankat-Buttgereit,-B; Goke,-B** 1997 Cloning and characterization of the 5' flanking sequences (promoter region) of the human GLP-1 receptor gene. *Peptides*. 1997; 18(5):617-24
- Larsen,-P-J; Tang-Christensen,-M; Holst,-J-J; Orskov,-C** 1997a Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience*. 1997 Mar; 77(1):257-70
- Larsen,-P-J; Tang-Christensen,-M; Jessop,-D-S** 1997b Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology*. 1997 Oct; 138(10):4445-55
- Larsson,-H; Holst,-J-J; Ahren,-B** 1997 Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic glucose production indirectly through insulin and glucagon in humans. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1997 Aug; 160(4):413-22
- Laughton,-N-M; Macallum,-A-B** 1932 The relation of duodenal mucosa to the internal secretion of the pancreas. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1932; 111:37-46
- Lauritsen,-K-B; Moody,-A-J; Christensen,-K-C; Jensen,-S-L** 1980 Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin release after small-bowel resection in man. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1980; 15:833-840
- Lauritsen,-K-B; Holst,-J-J; Moody,-A-J** 1981 Depression of insulin release by anti-GIP serum after oral glucose tolerance in rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1981; 16:417-421
- Leclercq-Meyer,-V; Malaisse,-W-J** 1996 Potentiation of glucagon-like peptide 1

insulinotropic action by succinic acid dimethyl ester. *Life Science*. 1996; 58(14):1195-9

- Lee,-C; Gardella,-T-J; Abou-Samra,-A-B; Nussbaum,-S-R; Segre,-G-V; Potts,-J-T,Jr; Kronenberg,-H-M; Jüppner,-H** 1994 Role of the extracellular regions of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor in hormone binding. *Endocrinology*. 1994; 135:1488-95
- Lee,-Y-C; Brubaker,-P-L; Drucker,-D-J** 1990 Development and tissue-specific regulation of proglucagon gene expression. *Endocrinology*. 1990; 127:2217-2222
- Leech,-C-A; Habener,-J-F** 1997 Insulinotropic glucagon-like peptide-1-mediated activation of non-selective cation currents in insulinoma cells is mimicked by maitotoxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997 Jul 18; 272(29):17987-93
- Leech,-C-A; Habener,-J-F** 1998 A role for Ca²⁺-sensitive nonselective cation channels in regulating the membranepotential of pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 1998 Jul; 47(7):1066-73
- Lefebvre,-P-J (ed)** 1996 Glucagon III. *Handbook of experimental pharmacology*. Springer. Berlin.1996. Vol 123
- Lin,-H-C; Zhao,-X-T; Wang,-L** 1997 Intestinal transit is more potently inhibited by fat in the distal (ileal brake) than in the proximal (jejunal brake) gut. *Digestive Diseases and Sciences*. 1997; 42:19-25
- Lin,-H-Y; Harris,-T-T-L; Flannery,-M-S; Aruffo,-A; Kaji,-E-H; Gorn,-A; Kolakowski,-L-F; Lodish,-H-F; Goldring,-S-R** 1991 Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science*. 1991; 254:1022-1024
- Lin,-S-C; Lin,-C-R; Gukovsky,-I; Luis,-A-J; Sawchenko,-P-E; Rosenfeld,-M-G** 1993 Molecular basis of the little mouse phenotype and implications for cell type-specific growth. *Nature*. 1993; 364:208-13
- Loew,-E-R; Grey,-J-S; Ivy,-A-C** 1940 Is a duodenal homon involved in carbohydrate metabolism? *The American Journal of Physiology*. 1940; 129:659-663
- Lopez,-L-C; Frazier,-M-L; Su,-C-J; Kumar,-A; Saunders,-G-F** 1983 Mammalian pancreatic proglucagon contains three glucagon-related peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1983; 80:5485-5489
- Lopez,-L-C; Li,-W-H;Frazier,-M-L; Luo,-C-C; Saunders,-G-F** 1984 Evolution of glucagon genes. *Molecular Biology and Evolution*. 1984; 1:335-344
- Lopez-Delgado,-M-I; Morales,-M; Villanueva-Penacarrillo,-M-L; Malaisse,-W-J; Valverde,-I** 1998 Effects of glucagon-like peptide 1 on the kinetics of glycogen

synthase a in hepatocytes from normal and diabetic rats. *Endocrinology*. 1998 Jun; 139(6):2811-7

- Lopez de Maturana,-R; Donnelly,-D** 2002 The glucagon-like peptide-1 receptor binding site for the N-terminus of GLP-1 requires polarity at Asp198 rather than negative charge. *FEBS Letters*. 2002; 530:244-48
- Loren,-I; Alumets,-J; Hakanson,-R; Sundler,-F; Thorell,-J** 1979 Gut-type glucagon immunoreactivity in nerves of the rat brain. *Histochemistry*. 1979; 61:335-341
- Lund,-P-K; Goodman,-R-H; Habener,-J-F** 1981 Intestinal glucagon mRNA identified by hybridization to a cloned islet cDNA encoding a precursor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1981; 100:1659-1666
- Lund,-P-K; Goodman,-R-H; Dee,-P-C; Habener,-J-F** 1982 Pankretic preproglucagon cDNA contains two glucagon-related coding sequences arranged in tandem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1982; 79:345-349
- Lund,-P-K; Goodman,-R-H; Montminy,-M-R; Dee,-P-C; Habener,-J-F** 1983 Angler fish islet pre-proglucagon II. Nucleotide and corresponding amino acid sequence of the cDNA. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983; 258:3280-3284
- MacLusky,-N-J; Cook,-S; Scrocchi,-L; Shin,-J; Kim,-J; Vaccarino,-F; Asa,-S-L; Drucker,-D-J** 2000 Neuroendocrine function and response to stress in mice with complete disruption of glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Endocrinology*. 2000 Feb; 141(2):752-62
- Marguet,-D; Baggio,-L; Kobayashi,-T; Bernard,-A-M; Pierres,-M; Nielsen,-P-F; Ribel,-U; Watanabe,-T; Drucker,-D-J; Wagtmann,-N** 2000 Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2000 Jun 6; 97(12):6874-9
- Marquez,-L; Trapote,-M-A; Luque,-M-A; Valverde,-I; Villanueva-Penacarrillo,-M-L** 1998 Inositolphosphoglycans possibly mediate the effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat liver and adipose tissue. *Cell Biochemistry and Function*. 1998 Mar; 16(1):51-6
- Mathi,-S-K; Chan,-Y; Li,-X; Wheeler,-M-B** 1997 Scanning of the glucagon-like peptide-1 receptor localizes G protein-activating determinants primarily to the N terminus of the third intracellular loop. *Molecular Endocrinology*. 1997 Apr; 11(4):424-32

- Matsuyama,-T; Hoffman,-W-H; Dunbar,-J-C; Foa,-N-L; Foa,-P-P** 1975 Glucose, insulin, pancreatic glucagon-like immunoreactive materials in the plasma of normal and diabetic children: effect of the initial insulin treatment. *Hormone and Metabolic Research*. 1975; 7:452-456
- Mayo,-I-E** 1992 Molecular cloning and expression and a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Molecular Endocrinology*. 1992; 6:1734-1744
- McIntyre,-N; Holsworth,-D-C; Turner,-D-S** 1964 New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet*. 1964; 2:20-21
- McMahon,-L-R; Wellman,-P-J** 1998 PVN infusion of GLP-1-(7-36) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats. *The American Journal of Physiology*. 1998 Jan; 274(1 Pt 2):R23-9
- Meeran,-K; O'Shea,-D; Edwards,-C-M; Turton,-M-D; Heath,-M-M; Gunn,-I; Abusnana,-S; Rossi,-M; Small,-C-J; Goldstone,-A-P; Taylor,-G-M; Sunter,-D; Steere,-J; Choi,-S-J; Ghatel,-M-A; Bloom,-S-R** 1999 Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology*. 1999 Jan; 140(1):244-50
- Meneilly,-G-S; Greig,-N; Tildesley,-H; Habener,-J-F; Egan,-J-M; Elahi,-D** 2003 Effects of 3 months of continuous administration of glucagon-like-peptide in elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003 Oct; 26(10):2835-41
- Merchenthaler,-I; Lane,-M; Shughrue,-P** 1999 Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*. 1999 Jan 11; 403(2):261-80
- Miki,-H; Namba,-M; Nishimura,-T; Mineo,-I; Matsumura,-T; Miyagawa,-J; Nakajima,-H; Kuwajima,-M; Hanafusa,-T; Matsuzawa,-Y** 1996 Glucagon-like peptide-1(7-36)amide enhances insulin-stimulated glucose uptake and decreases intracellular cAMP content in isolated rat adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996 Jun 13; 1312(2):132-6
- Miller,-C-P; Lin,-J-C; Habener,-J-F** 1993 Transcription of the rat glucagon gene by the cyclic AMP response element-binding protein CREB is modulated by adjacent CREB-associated proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 1993:7080-7090
- Moens,-K; Heimberg,-H; Flamez,-D; Huypens,-P; Quartier,-E; Ling,-Z; Pipeleers,-D; Gremlich,-S; Thorens,-B; Schuit,-F** 1996 Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide I, and glucose-dependent insulinotropic

- peptide receptors in rat pancreatic islet cells. *Diabetes*. 1996 Feb; 45(2):257-61
- Mojsov,-S; Heinrich,-G; Wilson,-I-B; Ravazzola,-M; Orci,-L; Habener,-J-F** 1986 Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *The Journal of Biological Chemistry*. 1986; 261:11880-11889
- Mojsov,-S; Weir,-G-C; Habener,-J-F** 1987 Insulinotropin: glucagon-like peptide-1(7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *The Journal of Clinical Investigation*. 1987; 79:616-619
- Mojsov,-S; Kopczynski,-M-G; Habener,-J-F** 1990 Both amidated and nonamidated forms of glucagon-like peptide I are synthesized in the rat intestine and the pancreas. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265:8001-8008
- Montrose-Rafizadeh,-C; Yang,-H; Wang,-Y; Roth,-J; Montrose,-M-H; Adams,-L-G** 1997 Novel signal transduction and peptide specificity of glucagon-like peptide receptor in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 1997 Sep; 172(3):275-83
- Montrose-Rafizadeh,-C; Avdonin,-P; Garant,-M-J; Rodgers,-B-D; Kole,-S; Yang,-H; Levine,-M-A; Schwindinger,-W; Bernier,-M** 1999 Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology*. 1999 Mar; 140(3):1132-40
- Moody,-A-J** 1980 Gut glucagon-like immunoreactivity. *Clinical Gastroenterology*. 1980; 9:699-709
- Mooradian,-A-D; Thurman,-J-E** 1999 Drug therapy of postprandial hyperglycemia. *Drugs*. 1999; 57:19-29
- Moore,-B; Edie,-E-S; Abram,-J-H** 1906 On the treatment of diabetes mellitus by acid extract of duodenal mucous membrane. *The Biochemical Journal*. 1906; 1:28-38
- Morgan,-L-M** 1979a Immunoassayable gastric inhibitory polypeptide. Investigations into its role in carbohydrate metabolism. *Annual Clinical Biochemistry*. 1979; 16:6-14
- Morgan,-L-M; Wright,-J-W; Marks,-V** 1979b The effect of oral galactose on GIP and insulin secretion in man. *Diabetologia*. 1979; 16:235-239
- Muhlhauser,-I-K; Berger,-M** 1985 Pharmacokinetics and bioavailability of injected glucagon: Differences between intramuscular, subcutaneous and intravenous

administration. *Diabetes Care*. 1985; 8:39-42

Nakabayashi,-H; Nishizawa,-M; Nakagawa,-A; Takeda,-R; Niijima,-A 1996 Vagal hepatopancreatic reflex effect evoked by intraportal appearance of tGLP-1. *The American Journal of Physiology*. 1996 Nov; 271(5 Pt 1):E808-13

Naslund,-E; Barkeling,-B; King,-N; Gutniak,-M; Blundell,-J-E; Holst,-J-J; Rossner,-S; Hellstrom,-P-M 1999 Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in obese men. *International-Journal of-Obesity-Related Metabolic Disorders*. 1999 Mar; 23(3):304-11

Nathan,-D-M; Schreiber,-E; Fogel,-H; Mojsov,-S; Habener,-J-F 1992 Insulinotropic action of glucagon-like peptide-I(7-37) administered to diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetes Care*. 1992; 15:270-276

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

Nauck,-M-A; Bartels,-E; Orskov,-C; Ebert,-R; Creutzfeldt,-W 1993b Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36)amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1993; 76:912-917

Nauck,-M-A; Kleine,-N; Orskov,-C; Holst,-J-J; Willms,-B; Creutzfeldt,-W 1993c Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide-1(7-36) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes patients. *Diabetologia*. 1993; 36:741-744

Nauck,-M-A; Wollschlager,-D; Werner,-J; Holst,-J-J; Orskov,-C; Creutzfeldt,-W; Willms,-B 1996 Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia*. 1996 Dec; 39(12):1546-53

Nauck,-M-A; Holst,-J-J; Willms,-B 1997a Glucagon-like peptide 1 and its potential in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Hormone and Metabolic Research*. 1997 Sep; 29(9):411-6

Nauck,-M-A; Niedereichholz,-U; Ettler,-R; Holst,-J-J; Orskov,-C; Ritzel,-R; Schmiegel,-W-H 1997b Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *The American Journal of Physiology*. 1997 Nov; 273(5 Pt 1):E981-8

- Nauck,-M-A; Sauerwald,-A; Ritzel,-R; Holst,-J-J; Schmiegel,-W** 1998 Influence of glucagon-like peptide 1 on fasting glycemia in type 2 diabetic patients treated with insulin after sulfonylurea secondary failure. *Diabetes Care*. 1998 Nov; 21(11):1925-31
- Navarro,-M; Rodriquez-de-Fonseca,-F; Alvarez,-E; Chowen,-J-A; Zueco,-J-A; Gomez,-R; Eng,-J; Blazquez,-E** 1996 Colocalization of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors, glucose transporter GLUT-2, and glucokinase mRNAs in rat hypothalamic cells: evidence for a role of GLP-1 receptor agonists as an inhibitory signal for food and water intake. *Journal of Neurochemistry*. 1996 Nov; 67(5): 1982-91
- Newton,-C-R** 1994 PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg. 1994
- Nishizawa,-M; Nakabayashi,-H; Kawai,-K; Ito,-T; Kawakami,-S; Nakagawa,-A; Niijima,-A; Uchida,-K** 2000 The hepatic vagal reception of intraportal GLP-1 is via receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 2000 Apr 12; 80(1-2):14-21
- Nishizawa,-M; Nakabayashi,-H; Uchida,-K; Nakagawa,-A; Niijima,-A** 1996 The hepatic vagal nerve is receptive to incretin hormone glucagon-like peptide-1, but not to glucose-dependent insulintropic polypeptide, in the portal vein. *The Journal of the Autonomic Nervous System*. 1996 Nov 6; 61(2):149-54
- Novak,-U; Wilks,-A; Buell,-G; McEwen,-S** 1987 Identical mRNA for preproglucagon in pancreas and gut. *European Journal of Biochemistry*. 1987; 164:553-558
- Nussdorfer,-G-G; Bahcelioglu,-M; Neri,-G; Malendowicz,-L-K** 2000 Secretin, glucagon, gastric inhibitory polypeptide, parathyroid hormone, and related peptides in the regulation of the hypothalamus- pituitary-adrenal axis. *Peptides*. 2000 Feb; 21(2):309-24
- O'Harte,-F-P; Gray,-A-M; Abdel-Wahab,-Y-H; Flatt,-P-R** 1997 Effects of non-glycated and glycated glucagon-like peptide-1(7-36) amide on glucose metabolism in isolated mouse abdominal muscle. *Peptides*. 1997; 18(9):1327-33
- O'Harte,-F-P; Abdel-Wahab,-Y-H; Conlon,-J-M; Flatt,-P-R** 1998 Glycation of glucagon-like peptide-1(7-36)amide: characterization and impaired action on rat insulin secreting cells. *Diabetologia*. 1998 Oct; 41(10):1187-93
- O'Harte,-F-P; Mooney,-M-H; Lawlor,-A; Flatt,-P-R** 2000 N-terminally modified glucagon-like peptide-1(7-36) amide exhibits resistance to enzymatic degradation

while maintaining its antihyperglycaemic activity in vivo. *Biochimica Biophysica Acta*. 2000 Mar 6; 1474(1):13-22

- O'Harte,-F-P; Mooney,-M-H; Kelly,-C-M; McKillop,-A-M; Flatt,-P-R** 2001 Degradation and glycemic effects of His(7)-glucitol glucagon-like peptide-1(7-36)amide in obese diabetic ob/ob mice. *Regulatory Peptides*. 2001 Jan 12; 96(3):95-104
- Ohnuma,-H; Yamatani,-K; Igarashi,-M; Sugiyama,-K; Manaka,-H; Tominaga,-M; Sasaki,-H** 1996 Intracerebroventricular injection of methylatropine suppresses insulin response to oral glucose load in rats. *The Journal of the Autonomic Nervous System*. 1996 Feb 5; 57(1-2):43-8
- Orci,-L; Bordi,-C; Unger,-R-H; Perrelet,-A** 1983 Glucagon and glicentin producing cells. In: Lefébre,-P-J (ed) *Glucagon I*. Springer, Berlin. 1983; Vol. 66:57-80
- Orskov,-C; Holst,-J-J** 1987a Radio-immunoassays for glucagon-like peptides 1 and 2 (GLP-1 and GLP-2). *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1987; 47:165-174
- Orskov,-C; Holst,-J-J; Poulsen,-S-S; Kirkegaard,-P** 1987b Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man. *Diabetologia*. 1987; 30:874-881
- Orskov,-C; Nielsen,-J-H** 1988 Truncated glucagon-like peptide-1(proglucagon 78-107 amide), an intestinal insulin-releasing peptide, has specific receptors on rat insulinoma cells (RIN5AH). *FEBS Letters*. 1988; 229:175-178
- Orskov,-C; Bersani,-M; Johnson,-A-H; Hofrup,-P; Holst,-J-J** 1989 Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine. *The Journal of Biological Chemistry*. 1989; 264:12826-12829
- Orskov,-C; Jeppesen,-J; Madsbad,-S; Holst,-JJ** 1991 Proglukagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine. *The Journal of Clinical Investigation*. 1991; 87:415-423
- Orskov,-C** 1992a Glucagon-like peptide 1, a new hormone of the enteroinsular axis. *Diabetologia*. 1992; 35:701-711
- Orskov,-C; Andreasen,-J; Holst,-J-J** 1992b All products of proglucagon are elevated in plasma from uremic patients. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1992; 74:379-384
- Orskov,-C; Wettergren,-A; Holst,-J-J** 1993 Biological effects and metabolic rates of glucagon-like peptide-1(7-36)amide and glucagon-like peptide-1(7-37) in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes*. 1993; 42:658-61

- Orskov,-C; Rabenhoj,-L; Wettergren,-A; Kofod,-H; Holst,-J-J** 1994 Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes*. 1994; 43:535-539
- Orskov,-C; Poulsen,-SS; Moller,-M; Holst,-JJ** 1996 GLP-1 receptors in the subfornical organs and the area postrema are accessible to circulation glucagon-like peptide. *Diabetes*. 1996; 45:832-835
- Orskov,-L; Holst,-J-J; Moller,-J; Orskov,-C; Moller,-N; Alberti,-K-G; Schmitz,-O** 1996 GLP-1 does not acutely affect insulin sensitivity in healthy man. *Diabetologia*. 1996 Oct; 39(10):1227-32
- O'Shea,-D; Gunn,-I; Chen,-X; Bloom,-S; Herbert,-J** 1996 A role for central glucagon-like peptide-1 in temperature regulation. *Neuroreport*. 1996 Feb 29; 7(3):830-2
- Pauly,-R-P; Demuth,-H-U; Rosche,-F; Schmidt,-J; White,-H-A; Lynn,-F; McIntosh,-C-H; Pederson,-R-A** 1999 Improved glucose tolerance in rats treated with the dipeptidyl peptidase IV (CD26) inhibitor Ile-thiazolidide. *Metabolism*. 1999 Mar; 48(3):385-9
- Pederson,-R-A; Schubert,-H-E; Brown,-J-C** 1975 Gastric inhibitory polypeptide. Its physiological release and insulinotropic action in the dog. *Diabetes*. 1975; 24:1050-1056
- Pederson,-R-A; Brown,-J-C** 1976 The insulinotropic actions of gastric inhibitory polypeptide in the perfused isolated rat pancreas. *Endocrinology*. 1976; 99:780-785
- Pederson,-R-A; White,-H-A; Schlenzig,-D; Pauly,-R-P; McIntosh,-C-H; Demuth,-H-U** 1998 Improved glucose tolerance in Zucker fatty rats by oral administration of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor isoleucine thiazolidide. *Diabetes*. 1998 Aug; 47(8):1253-8
- Perfetti,-R; Zhou,-J; Doyle,-M-E; Egan,-J-M** 2000 Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology*. 2000 Dec; 141(12):4600-5
- Perley,-M-J; Kipnis,-D-M** 1967 Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose. Studies in normal and diabetic subjects. *The Journal of Clinical Investigation*. 1967; 46:1954-1962
- Perret,-J; van Craenenbroeck,-M; Langer,-I; Vertongen,-P; Gregoire,-F; Robberecht,-P; Waelbroeck,-M** 2002 Mutational analysis of the glucagons receptor:

similarities with the vasoactive intestinal peptide (VIP)/pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP)/secretin receptors for recognition of the ligand's third residue. *The Biochemical Journal*. 2002; 362:389-94

Peters,-T Jr 1985 Serum albumin. *Advances in Protein Chemistry*. 1985; 37:161-245

Philippe,-J; Drucker,-D-J; Habener,-J-F 1987 Glucagon gene transcription in an islet cell line is regulated via a protein kinase C-activated pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262:1823-1828

Philippe,-J; Drucker,-D-J; Knepel,-W; Jepeal,-L; Misulovin,-Z; Habener,-J-F 1988 Alpha cell-specific expression of the glucagon gene is conferred to the glucagon promoter element by the interactions of DNA-binding proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 1988; 8:4877-4888

Philippe,-J; Morel,-C; Cordier-Bussat,-M 1995 Islet-specific proteins interact with the insulin-response element of the glucagon gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270:3039-3045

Plisetskaya,-E-M; Mommsen,-T-P 1996 Glucagon and glucagon-like peptide in fishes. *International Review of Cytology*. 1996; 168:187-257

Pohl,-M; Wank,-S-A 1998 Molecular cloning of the helodermin and exendin-4 cDNAs in the lizard. Relationship to vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and glucagon-like peptide 1 and evidence against the existence of mammalian homologues. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273:9778-9884

Polak,-J-M; Bloom,-S-R; Coulling,-I; Pearse,-A-G-E 1971 Immunofluorescent localization of enteroglucagon cells in the gastrointestinal tract of the dog. *Gut*. 1971; 12:311-318

Polak,-J-A; Bloom,-S-R 1982 Localization of regulatory peptides in the gut. *British Medical Bulletin*. 1982; 38:303-307

Pridal,-L; Deacon,-C-F; Kirk,-O; Christensen,-J-V; Carr,-R-D; Holst,-J-J 1996 Glucagon-like peptide-1(7-37) has a larger volume of distribution than glucagon-like peptide-1(7-36)amide in dogs and is degraded more quickly in vitro by dog plasma. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 1996 Jan-Mar; 21(1):51-9

Rabinovitch,-A; Dupré,-J 1972 Insulinotropic and glucagonotropic activities of crude preparation of cholecystokinin-pancreozymin. *Clinical Research*. 1972; 20:945 (Abstract)

- Rachman,-J; Gribble,-F-M; Barrow,-B-A; Levy,-J-C; Buchanan,-K-D; Turner,-R-C** 1996 Normalization of insulin responses to glucose by overnight infusion of glucagon-like peptide 1 (7-36) amide in patients with NIDDM. *Diabetes*. 1996 Nov; 45(11):1524-30
- Rachman,-J; Barrow,-B-A; Levy,-J-C; Turner,-R-C** 1997 Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM. *Diabetologia*. 1997 Feb; 40(2):205-11
- Raufman,-J-P** 1996 Bioactive peptides from lizard venoms. *Regulatory Peptides*. 1996; 61:1-18
- Ravazzola,-M; Siperstein,-A; Moody,-A-J; Sundby,-F; Jacobsen,-H; Orci,-L** 1979 Glicentin immunoreactive cells: their relationship to glucagon-producing cells. *Endocrinology*. 1979; 105:499-508
- Richter,-G; Göke,-R; Göke,-B; Arnold,-R** 1990 Characterization of receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat lung membranes. *FEBS Letters*. 1990; 267:78-80
- Richter,-G; Göke,-R; Göke,-B; Schmidt,-H; Arnold,-R** 1991 Characterization of glucagon-like peptide-1(7-36)amide receptors of rat lung membranes by covalent cross-linking. *FEBS Letters*. 1991; 280:247-250
- Richter,-G; Feddersen,-O; Wagner,-U; Barth,-P; Göke,-R; Göke,-B** 1993 GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery. *The American Journal of Physiology*. 1993; 265:L374-L381
- Rinaman,-L** 1999a Interoceptive stress activates glucagon-like peptide-1 neurons that project to the hypothalamus. *The American Journal of Physiology*. 1999 Aug; 277(2 Pt 2):R582-90
- Rinaman,-L** 1999b A functional role for central glucagon-like peptide-1 receptors in lithium chloride-induced anorexia. *The American Journal of Physiology*. 1999 Nov; 277(5 Pt 2):R1537-40
- Rinaman,-L; Comer,-J** 2000 Antagonism of central glucagon-like peptide-1 receptors enhances lipopolysaccharide-induced fever. *Autonomic Neuroscience*. 2000 Dec 20; 85(1-3):98-101
- Rindi,-G-S; Grant,-G-N; Yiangou,-Y; Ghatei,-M-A; Bloom,-S-R; Bantach,-V-L; Socia,-E; Polak,-J-M** 1990 Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. *The American Journal of Pathology*. 1990; 136:1349-1363

- Ritzel,-R; Orskov,-C; Holst,-J-J; Nauck,-M-A** 1995 Pharmacokinetic, insulinotropic and glucagonostatic properties of GLP-1(7-36)amide after subcutaneous injection in healthy volunteers: Dose-response-relationships. *Diabetologia*. 1995; 38:720-725
- Ritzel,-U; Fromme,-A; Otteleben,-M; Leonhardt,-U; Ramadori,-G** 1997 Release of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) by carbohydrates in the perfused rat ileum. *Acta Diabetologica*. 1997 Mar; 34(1):18-21
- Ritzel,-U; Leonhardt,-U; Otteleben,-M; Ruhmann,-A; Eckart,-K; Spiess,-J; Ramadori,-G** 1998 A synthetic glucagon-like peptide-1 analog with improved plasma stability. *The Journal of Endocrinology*. 1998 Oct; 159(1):93-102
- Robberecht,-P; Gourlet,-P; De Neef,-P; Woussen-Colle,-M-C; Vandermeers-Piret,-M-C; Vandermeers,-A; Christophe,-J** 1992 Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (PACAP) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma NB-OK-1 cell membranes. *European Journal of Biochemistry*. 1992; 207:239-46
- Roberge,-J-N; Brubaker,-P-L** 1991 Secretion of proglucagon-derived peptides in response to intestinal luminal nutrients. *Endocrinology*. 1991; 128:3169-3174
- Roberge,-J-N; Brubaker,-P-L** 1993 Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enterodendocrine loop. *Endocrinology*. 1993; 133:233-240
- Rocca,-A-S; Brubaker,-P-L** 1995 Stereospecific effects of fatty acids on proglucagon-derived peptide secretion in fetal rat intestinal cultures. *Endocrinology*. 1995; 136:5593-5599
- Rocca,-A-S; Brubaker,-P-L** 1999 Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology*. 1999 Apr; 140(4):1687-94
- Rocca,-A-S; LaGreca,-J; Kalitsky,-J; Brubaker,-P-L** 2001 Monounsaturated fatty acid diets improve glycemic tolerance through increased secretion of glucagon-like peptide-1. *Endocrinology*. 2001 Mar; 142(3):1148-55
- Rodriquez-de-Fonseca,-F; Navarro,-M; Alvarez,-E; Roncero,-I; Chowen,-J-A; Maestre,-O; Gomez,-R; Munoz,-R-M; Eng,-J; Blazquez,-E** 2000 Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism*. 2000 Jun; 49(6):709-17
- Ross,-S-A; Dupré,-J** 1978 Effects of ingestion of triglyceride or galactose on

secretion of gastric inhibitory polypeptide and on responses to intravenous glucose in normal and diabetic subjects. *Diabetes*. 1978; 27:327-333

Rothenberg,-M-E; Eilertson,-C-D; Klein,-K; Zhou,-Y; Lindberg,-I; McDonald,-J-K; Mackin,-R-B; Noe,-B-D 1995 Processing of mouse proglucagon by recombinant prohormone convertase 1 and immunopurified prohormone convertase 2 in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270:10136-10146

Rothenberg,-M-E; Eilertson,-C-D; Klein,-K; Mackin,-R-B; Noe,-B-D 1996 Evidence of redundancy in propeptide/prohormone convertase activities in processing proglucagon: an antisense study. *Molecular Endocrinology*. 1996; 10:331-341

Rouille,-Y; Westermark,-G; Martin,-S-K; Steiner,-D-F 1994 Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in α TC1-6 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1994; 91:3242-3246

Rouille,-Y; Martin,-S; Steiner,-D-F 1995 Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270:26488-26496

Rouille,-Y; Kantengwa,-S; Irminger,-J-C; Halban,-P-A 1997a Role of the prohormone convertase PC3 in the processing of proglucagon to glucagon-like peptide 1. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997 Dec 26; 272(52):32810-6

Rouille,-Y; Bianchi,-M; Irminger,-J-C; Halban,-P-A 1997b Role of the prohormone convertase PC2 in the processing of proglucagon to glucagon. *FEBS-Letters*. 1997 Aug 11; 413(1):119-23

Ruiz-Grande,-C; Alarcon,-C; Alacantara,-A; Castilla,-C; Lopez-Novoa,-J-M; Villanueva-Penacarrillo,-M-L; Valverde,-I 1993 Renal catabolism of truncated glucagon-like peptide-1. *Hormone and Metabolic Research*. 1993; 25:612-616

Runge,-S; Wulff,-B-S; Madsen,-K; Bräuner-Osborne,-H; Knudsen,-L-B 2003a Different domains of the glucagons and glucagons-like peptide-1 receptors provide the critical determinants of ligand selectivity. *British Journal of Pharmacology*. 2003; 138:787-94

Runge,-S; Gram,-C; Bräuner-Osborne,-H; Madsen,-K; Knudsen,-L-B; Wulff,-B-S 2003b Three distinct epitopes on the extracellular face of the glucagons receptor determine specificity for the glucagons amino terminus. *The Journal of Biological*

Chemistry. 2003; 278:28005-28010

- Rowland,-N-E; Crews,-E-C; Gentry,-R-M** 1997 Comparison of Fos induced in rat brain by GLP-1 and amylin. *Regulatory Peptides*. 1997 Aug 29; 71(3):171-4
- Ryan,-A-S; Egan,-J-M; Habener,-J-F; Elahi,-D** 1998 Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1-(7-37) appears not to augment insulin-mediated glucose uptake in young men during euglycemia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1998 Jul; 83(7):2399-404
- Saifia,-S; Chevrier,-A-M; Bosshard,-A; Cuber,-J-C; Chayvialle,-J-A; Abello,-J** 1998 Galanin inhibits glucagon-like peptide-1 secretion through pertussis toxin-sensitive G protein and ATP-dependent potassium channels in rat ileal L-cells. *The Journal of Endocrinology*. 1998 Apr; 157(1):33-41
- Salazaar,-I; Vaillant,-C** 1990 Glucagon-like immunoreactivity in hypothalamic neurons of the rat. *Cell and Tissue Research*. 1990; 261:255-260
- Salapatek,-A-M; MacDonald,-P-E; Gaisano,-H-Y; Wheeler,-M-B** 1999 Mutations to the third cytoplasmic domain of the glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor can functionally uncouple GLP-1-stimulated insulin secretion in HIT-T15 cells. *Molecular Endocrinology*. 1999 Aug; 13(8):1305-17
- Sander,-M; Neubuser,-A; Kalamaras,-J; Ee,-H-C; Martin,-G-R; German,-M-S** 1997 Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes and Development*. 1997; 11:1662-1673
- Sandhu,-H; Wiesenthal,-S-R; MacDonald,-P-E; McCall,-R-H; Tchipashvili,-V; Rashid,-S; Satkunarajah,-M; Irwin,-D-M; Shi,-Z-Q; Brubaker,-P-L; Wheeler,-M-B; Vranic,-M; Efendic,-S; Giacca,-A** 1999 Glucagon-like peptide 1 increases insulin sensitivity in depancreatized dogs. *Diabetes*. 1999 May; 48(5):1045-53
- Schipani,-E; Kruse,-K; Juppner,-H** 1995 A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia. *Science*. 1995; 268:98-100
- Schirra,-J; Katschinski,-M; Weidmann,-C; Schafer,-T; Wank,-U; Arnold,-R; Goke,-B** 1996 Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. *The Journal of Clinical Investigation*. 1996 Jan 1; 97(1):92-103
- Schirra,-J; Kuwert,-P; Wank,-U; Leicht,-P; Arnold,-R; Göke,-B; Katschinski,-M** 1997 Differential effects of subcutaneous GLP-1 on gastric emptying, antroduodenal motility, and pancreatic function in men. *Proceedings of the*

Association of American Physicians. 1997; 109:84-97

- Schirra,-J; Sturm,-K; Leicht,-P; Arnold,-R; Goke,-B; Katschinski,-M** 1998a
Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998 Apr 1; 101(7):1421-30
- Schirra,-J; Leicht,-P; Hildebrand,-P; Beglinger,-C; Arnold,-R; Goke,-B; Katschinski,-M** 1998b Mechanisms of the antidiabetic action of subcutaneous glucagon-like peptide-1(7-36)amide in non-insulin dependent diabetes mellitus. *The Journal of Endocrinology*. 1998 Jan; 156(1):177-86
- Schirra,-J; Houck,-P; Wank,-U; Arnold,-R; Goke,-B; Katschinski,-M** 2000 Effects of glucagon-like peptide-1(7-36)amide on antro-pyloro-duodenal motility in the interdigestive state and with duodenal lipid perfusion in humans. *Gut*. 2000 May; 46(5):622-31
- Schjoldager,-B-T; Mortensen,-P-E; Christiansen,-J; Orskov,-C; Holst,-J-J;** 1989 GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans. *Digestive Diseases and Sciences*. 1989; 34:703-708
- Schmidt,-W-E; Siegel,-E-G; Creutzfeldt,-W** 1985 Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia*. 1985; 28:704-707
- Schwaninger,-M; Lux,-G; Blume,-R; Oetjen,-E; Hidaka,-H; Knepel,-W** 1993 Membrane depolarization and calcium influx induce glucagon gene transcription in pancreatic islet cells through the cyclic AMP-responsive element. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268:5168-5177
- Scrocchi,-L-A; Marshall,-B-A; Cook,-S-M; Brubaker,-P-L; Drucker,-D-J** 1998 Identification of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) actions essential for glucose homeostasis in mice with disruption of GLP-1 receptor signaling. *Diabetes*. 1998 Apr; 47(4):632-9
- Seeley,-R-J; Blake,-K; Rushing,-P-A; Benoit,-S; Eng,-J; Woods,-S-C; D'Alessio,-D** 2000 The role of CNS glucagon-like peptide-1 (7-36) amide receptors in mediating the visceral illness effects of lithium chloride. *The Journal of Neuroscience*. 2000 Feb 15; 20(4):1616-21
- Segre,-G-V; Goldring,-R** 1993 Receptors for Secretin, Calcitonin, Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-Related Peptide, Vasoactive Intestinal Peptide, Glucagonlike Peptide 1, Growth Hormone-Releasing Hormone, and Glucagon

- Belong to a Newly Discovered G-Protein-Linked Receptor Family. Trends in Endocrinology and Metabolism. 1993; 4:309-314
- Shalev,-A; Ninnis,-R; Keller,-U** 1998 Effects of glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) on glucose kinetics during somatostatin-induced suppression of insulin secretion in healthy men. Hormone Research. 1998; 49(5):221-5
- Shima,-K; Hirota,-M; Ohboshi,-C; Sato,-M; Nishino,-T** 1987 Release of glucagon-like peptide-1 immunoreactivity from the perfused rat pancreas. Acta Endocrinologica. 1987; 114:531-536
- Shimizu,-I; Hirota,-M; Ohboshi,-C; Shima,-K** 1987 Identification and localization of glucagon-like peptide-1 and its receptor in rat brain. Endocrinology. 1987; 121:1076-1082
- Shmitz,-O; Nyholm,-B; Orskov,-L; et al.** 1997 Effects of amylin and the amylin agonist pramlintide on glucose metabolism. Diabetic Medicine. 1997; 14 Suppl. 2:S19-23
- Shughrue,-P-J; Lane,-M-V; Merchenthaler,-I** 1996 Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. Endocrinology. 1996 Nov; 137(11):5159-62
- Siegel,-E-G; Scharf,-G; Gallwitz,-B; Mentlein,-R; Morys-Wortmann,-C; Folsch,-U-R; Schmidt,-W-E** 1999 Comparison of the effect of native glucagon-like peptide 1 and dipeptidyl peptidase IV-resistant analogues on insulin release from rat pancreatic islets. European Journal of Clinical Investigation. 1999 Jul; 29(7):610-4
- Sjolund,-D; Sanden,-G; Hakanson,-R; Sundler,-F** 1983 Endocrine cells in human intestine. An immunocytochemical study. Gastroenterology. 1983; 85:1120-1130
- Skoglund,-G; Hussain,-M-A; Holz,-G-G** 2000 Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene promoter activity by protein kinase A-independent activation of the rat insulin I gene cAMP response element. Diabetes. 2000 Jul; 49(7):1156-64
- Solano,-R-M; Langer,-I; Perret,-J; Vertongen,-P; Juarranz,-M-G; Robberecht,-P; Waelbroeck,-M** 2001 Two basic residues of the h-VPAC1 receptor second transmembrane helix are essential for ligand binding and signal transduction. The Journal of Biological Chemistry. 2001; 276:1084-88
- Spengler,-D; Waeber,-C; Pataloni,-C; Holsboer,-F; Bockaert,-J; Seeburg,-P-H; Journot,-L** 1993 Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. Nature. 1993; 365:170-175

- Spiller,-R-C; Trotman,-I-F; Higgins,-B-E; Gbatei,-M-A; Grimble,-G-K; Lee,-Y-C; Bloom,-S-R; Misiewicz,-J-J; Silk,-D-B** 1984 The ileal brake – inhibition of jejunal motility after ileal fat perfusion in man. *Gut*. 1984; 25:365-374
- Stang,-M; Wysowski,-D-K; Butler Jones,-D** 1999 Incidence of lactic acidosis in metformin users. *Diabetes Care*. 1999; 22:925-7
- Steiner,-D-F** 1998 The proprotein convertases. *Current Opinion in Chemical Biology*. 1998; 2:31-39
- Stoffel,-M; Espinoza,-R; LeBeau,-M-M; Bell,-G-I** 1993 Human glucagon-like peptide-1 receptor gene. Localization to chromosome 6p21 by fluorescence in situ hybridization and linkage of a highly polymorphic simple tandem repeat DNA polymorphism to other markers on chromosome 6. *Diabetes*. 1993; 42:1215-1218
- Stoffers,-D-A; Kieffer,-T-J; Hussain,-M-A; Drucker,-D-J; Bonner-Weir,-S; Habener,-J-F; Egan,-J-M** 2000 Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes*. 2000 May; 49(5): 741-8
- St-Onge,-L; Sosa-Pineda,-B** 1997 Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature*. 1997; 387:406-409
- Stroop,-S-D; Kuestner,-R-E; Serwold,-T-F; Chen,-L; Moore,-E-E** 1995 Chimeric human calcitonin and glucagon receptors reveal two dissociable calcitonin interaction sites. *Biochemistry*. 1995; 34:1050-57
- Suga,-S; Kanno,-T; Ogawa,-Y; Takeo,-T; Kamimura,-N; Wakui,-M** 2000 cAMP-independent decrease of ATP-sensitive K⁺ channel activity by GLP-1 in rat pancreatic beta-cells. *Pflugers Archives*. 2000 Aug; 440(4):566-72
- Sugiyama,-K; Manaka,-H; Kato,-T; Yamatani,-K; Tominaga,-M; Sasaki,-H** 1994 Stimulation of truncated glucagon-like peptide-1 release from the isolated perfused canine ileum by glucose absorption. *Digestion*. 1994; 55:24-28
- Susini,-S; Roche,-E; Prentki,-M; Schlegel,-W** 1998 Glucose and glucoincretin peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in pancreatic beta(INS-1) cells. *The FASEB Journal*. 1998 Sep; 12(12): 1173-82
- Sykes,-S; Morgan,-L-M; English,-J; Marks,-V** 1980 Evidence for preferential stimulation of gastric inhibitory polypeptide secretion in the rat by actively transported carbohydrates and their analogues. *The Journal Endocrinology*. 1980; 85:201-207

- Szayna,-M; Doyle,-M-E; Betkey,-J-A; Holloway,-H-W; Spencer,-R-G; Greig,-N-H; Egan,-J-M** 2000 Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. *Endocrinology*. 2000 Jun; 141(6):1936-41
- Tager,-H; Hohenboken,-M; Markese,-J; Dinerstein,-R-J** 1980 Identification and localization of glucagon-related peptides in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1980; 77:6229-6233
- Takhar,-S; Gyomory,-S; Su,-R-C; Mathi,-S-K; Li,-X; Wheeler,-M-B** 1996 The third cytoplasmic domain of the GLP-1[7-36 amide] receptor is required for coupling to the adenylyl cyclase system. *Endocrinology*. 1996 May; 137(5):2175-8
- Tang-Christensen,-M; Larsen,-P-J; Goke,-R; Fink-Jensen,-A; Jessop,-D-S; Moller,-M; Sheikh,-S-P** 1996 Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *The American Journal of Physiology*. 1996 Oct; 271(4 Pt 2):R848-56
- Tang-Christensen,-M; Vrang,-N; Larsen,-P-J** 1998 Glucagon-like peptide 1(7-36) amide's central inhibition of feeding and peripheral inhibition of drinking are abolished by neonatal monosodium glutamate treatment. *Diabetes*. 1998 Apr; 47(4):530-7
- Thiele,-T-E; Seeley,-R-J; D'Alessio,-D; Eng,-J; Bernstein,-I-L; Woods,-S-C; van-Dijk,-G** 1998 Central infusion of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide (GLP-1) receptor antagonist attenuates lithium chloride-induced c-Fos induction in rat brainstem. *Brain Research*. 1998 Aug 10; 801(1-2):164-70
- Thomas,-F-B; Mazzaferri,-E-L; Crockett,-S-E; Mekjian,-H-S; Cataland,-S** 1976 Stimulation of secretion of gastric inhibitory polypeptide and insulin by intraduodenal amino acid perfusion. *Gastroenterology*. 1976; 70:523-527
- Thomsen,-C; Rasmussen,-O; Lousen,-T; Holst,-J-J; Fenselau,-S; Schrezenmeir,-J; Hermansen,-K** 1999 Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1999 Jun; 69(6):1135-43
- Thorens,-B** 1992 Expression cloning of the pancreatic β cell receptor for the glucagon-like peptide 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1992; 89:8641-8645
- Thorens,-B; Porret,-A; Bühler,-L; Deng,-S-P; Morel,-P; Widman,-C** 1993 Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor: demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-9(9-39) an antagonist of the receptor.

Diabetes. 1993; 42:1678-1682

Todd,-J-F; Wilding,-J-P; Edwards,-C-M; Khan,-F-A; Ghatei,-M-A; Bloom,-S-R

1997 Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): a trial of treatment in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation*. 1997 Jun; 27(6):533-6

Todd,-J-F; Edwards,-C-M; Ghatei,-M-A; Mather,-H-M; Bloom,-S-R 1998

Subcutaneous glucagon-like peptide-1 improves postprandial glycaemic control over a 3-week period in patients with early type 2 diabetes. *Clinical Science*. 1998 Sep; 95(3): 325-9

Toft-Nielson,-M; Madsbad,-S; Holst,-J-J 1996 The effect of glucagon-like peptide I

(GLP-I) on glucose elimination in healthy subjects depends on the pancreatic glucoregulatory hormones. *Diabetes*. 1996 May; 45(5):552-6

Toft-Nielsen,-M; Madsbad,-S; Holst,-J-J 1998 Exaggerated secretion of glucagon-

like peptide-1 (GLP-1) could cause reactive hypoglycaemia. *Diabetologia*. 1998 Oct; 41(10):1180-6

Toft-Nielsen,-M-B; Madsbad,-S; Holst,-J-J 1999 Continuous subcutaneous infusion

of glucagon-like peptide 1 lowers plasma glucose and reduces appetite in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 1999 Jul; 22(7):1137-43

Trapote,-M-A; Clemente,-F; Galera,-C; Morales,-M; Alcantara,-A-I; Lopez-

Delgado,-M-I; Villanueva-Penacarrillo,-M-L; Valverde,-I 1996

Inositolphosphoglycans are possible mediators of the glucagon-like peptide 1 (7-36)amide action in the liver. *Journal of Endocrinology Investigation*. 1996 Feb; 19(2):114-8

Tritos,-N-A; Vicent,-D; Gillette,-J; Ludwig,-D-S; Flier,-E-S; Maratos-Flier,-E

1998 Functional interactions between melanin-concentrating hormone, neuropeptide Y, and anorectic neuropeptides in the rat hypothalamus. *Diabetes*. 1998 Nov; 47(11):1687-92

Tseng,-C-C; Lin,-L 1997 A point mutation in the glucose-dependent insulinotropic

peptide receptor confers constitutive activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 1997; 232:96-100

Tucker,-J-D; Dhanvantari,-S; Brubaker,-P-L 1996 Proglucagon processing in islet

and intestinal cell lines. *Regulatory Peptides*. 1996 Apr 9; 62(1):29-35

Turner,-P-R; Bambino,-T; Nissenson,-R-A 1996 A Putative Selectivity Filter in the

G-protein-coupled Receptors for Parathyroid Hormone and Secretin. *The Journal*

of Biological Chemistry. 1996 April 19; 271:9205-9208

Turton,-M-D; O'Shea,-D; Gunn,-I; Beak,-S-A; Edwards,-C-M; Meeran,-K; Choi,-S-J; Taylor,-G-M; Heath,-M-M; Lambert,-P-D; Wilding,-J-P; Smith,-D-M; Ghatei,-M-A; Herbert,-J; Bloom,-S-R 1996 A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*. 1996 Jan 4; 379(6560):69-72

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group 1998a Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998; 352:837-53

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group 1998b Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*. 1998; 352:854-65

Unger,-R-H; Eisentraut,-A-M; Sims,-K; McCall,-M-S; Madison,-L-L 1961 Sites of origin of glucagon in dogs and humans. *Clinical Research*. 1961; 9:53 (Abstract)

Unger,-R-H; Ohneda,-A; Valverde,-I 1968 Characterization of the responses of circulating glucagon-like immunoreactivity to intraduodenal and intravenous administration of glucose. *The Journal of Clinical Investigation*. 47:48-65

Unger,-R-H; Eisentraut,-A-M 1969 Entero-insular axis. *Archives of Internal Medicine*. 1969; 123:261-266

Unson,-C-G; Macdonald,-D; Ray,-K; Durrah,-T-L; Merrifield,-R-B 1991 Position 9 replacement analogs of glucagon uncouple biological activity and receptor binding. *The Journal of Biological Chemistry*. 1991; 266:2763-66

Unson,-C-G; Macdonald,-D; Merrifield,-R-B 1993 The role of histidine-1 in glucagon action. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993; 300:747-50

Unson,-C-G; Wu,-C-R; Merrifield,-R-B 1994a Roles of aspartic acid 15 and 21 in glucagon action: receptor anchor and surrogates for aspartic acid 9. *Biochemistry*. 1994; 33:6884-87

Unson,-C-G; Merrifield,-R-B 1994b Identification of an essential serine residue in glucagon: implication for an active site triad. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1994; 91:454-58

Unson,-C-G; Wu,-C-R; Fithpatrick,-K-J; Merrifield,-R-B 1994c Multiple-site replacement analogs of glucagon. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269:12548-51

- Unson,-C-G; Cypess,-A-M; Kim,-H-N; Goldsmith,-P-K; Carruthers,-C-J-L; Merrifield,-R-B; Sakmar,-T-P** 1995 Characterization of deletion and truncation mutants of the rat glucagon receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270(46):27720-27
- Unson,-C-G; Cypess,-A-M; Wu,-C-R; Goldsmith,-P-K; Merrifield,-R-B; Sakmar,-T-P** 1996 Antibodies against specific extracellular epitopes of the glucagons receptor block glucagon binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1996; 93:310-15
- Unson,-C-G; Wu,-C-R; Jiang,-Y; Yoo,-B; Cheung,-C; Sakmar,-T-P; Merrifield,-R-B** 1998 Roles of specific extracellular domains of the glucagon receptor in ligand binding and signaling. *Biochemistry*. 1998; 41:11795-11803
- Usdin,-T-B; Mezey,-E; Button,-D-C** 1993 Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology*. 1993; 133:2861-2870
- Uttenthal,-L-O; Ghiglione,-M; George,-S-K; Bishop,-A-E; Polak,-J-M; Bloom,-S-R** 1985 Molecular forms of glucagon-like peptide-1 in human pancreas and glucagonomas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1985; 61:472-479
- van-Delft,-J; Uttenthal,-L-O; Hermida,-O-G; Fontela,-T; Ghiglione,-M** 1997 Identification of amidated forms of GLP-1 in rat tissues using a highly sensitive radioimmunoassay. *Regulatory Peptides*. 1997 Jun 18; 70(2-3):191-8
- van-Dijk,-G; Thiele,-T-E; Donahay,-J-C; Campfield,-L-A; Smith,-F-J; Burn,-P; Bernstein,-I-L; Woods,-S-C; Seeley,-R-J** 1996 Central infusions of leptin and GLP-1-(7-36) amide differentially stimulate c-FLI in the rat brain. *The American Journal of Physiology*. 1996 Oct; 271(4 Pt 2):R1096-100
- van Eyll,-B; Lankat-Buttgereit,-B; Bode,-H-P; Göke,-R; Göke,-B** 1994 Signal transduction of the GLP-1 receptor cloned from a human insulinoma. *FEBS Letters*. 1994; 348:7-13
- van-Eyll,-B; Goke,-B; Wilmen,-A; Goke,-R** 1996 Exchange of W39 by A within the N-terminal extracellular domain of the GLP-1 receptor results in a loss of receptor function. *Peptides*. 1996; 17(4):565-70
- Vara,-E; Arias-Diaz,-J; Garcia,-C; Balibrea,-J-L; Blazquez,-E** 2001 Glucagon-like peptide-1(7-36) amide stimulates surfactant secretion in human type II

pneumocytes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001 Mar; 163(4):840-6

Varndell,-I-M; Bishop,-A; Sikri,-E; Uttenthal,-L-O; Bloom,-S-R; Polak,-J-M

1985 Localization of glucagon-like peptide (GLP) immunoreactants in human gut and pancreas using light and electron microscopic immunocytochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1985; 33:1080-1086

Vella,-A; Shah,-P; Basu,-R; Basu,-A; Holst,-J-J; Rizza,-R-A 2000 Effect of

glucagon-like peptide 1(7-36) amide on glucose effectiveness and insulin action in people with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000 Apr; 49(4):611-7

Vilardaga,-J-P; di-Paolo,-E; de-Neef,-P; Waelbroeck,-M; Bollen,-A; Robberecht,-

P 1996 Lysine 173 residue within the first exolooop of rat secretin receptor is involved in carboxylate moiety recognition of Asp 3 in secretin. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 1996 Jan 26; 218(3):842-6

Vilardaga,-J-P; Lin,-I; Nissenson,-R-A 2001 Analysis of parathyroid hormone

(PTH)/secretin receptor chimeras differentiates the role of functional domains in the PTH/PTH-related peptide (PTHrP) receptor on hormone binding and receptor activation. *Molecular Endocrinology*. 2001; 15(7):1186-1199

Vilsboll,-T; Krarup,-T; Madsbad,-S; Holst,-J-J 2001 No reactive hypoglycaemia in

Type 2 diabetic patients after subcutaneous administration of GLP-1 and intravenous glucose. *Diabetic Medicine*. 2001 Feb; 18(2):144-9

Wang,-T; Edwards,-G-L; Baile,-C-A 1998 Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide

administered into the third cerebroventricle inhibits water intake in rats. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. 1998 Oct; 219(1):85-91

Wang,-X; Cahill,-C-M; Pineyro,-M-A; Zhou,-J; Doyle,-M-E; Egan,-J-M 1999

Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology*. 1999 Oct; 140(10):4904-7

Wang,-X; Zhou,-J; Doyle,-M-E; Egan,-J-M 2001 Glucagon-like peptide-1 causes

pancreatic duodenal homeobox-1 protein translocation from the cytoplasm to the nucleus of pancreatic beta-cells by a cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A-dependent mechanism. *Endocrinology*. 2001 May; 142(5):1820-7

Wang,-Y; Kole,-H-K; Montrose-Rafizadeh,-C; Perfetti,-R; Bernier,-M; Egan,-J-

M 1997 Regulation of glucose transporters and hexose uptake in 3T3-L1 adipocytes:

glucagon-like peptide-1 and insulin interactions. *The Journal of Molecular Endocrinology*. 1997 Dec; 19(3):241-8

- Wei,-Y; Mojsov,-S** 1995 Tissue specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-1. Brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Letters*. 1995; 358:219-224
- Weir,-G-C; Mojsov,-S; Hendrick,-G-K; Habener,-J-F** 1989 Glucagon-like peptide I(7-37) actions on the endocrine pancreas. *Diabetes*. 1989; 38:338-342
- Wettergren,-A; Maina,-P; Boesby,-S; Holst,-J-J** 1997a Glucagon-like peptide-1 7-36 amide and peptide YY have additive inhibitory effect on gastric acid secretion in man. *Scandinavian Journal Gastroenterology*. 1997 Jun; 32(6):552-5
- Wettergren,-A; Wojdemann,-M; Meisner,-S; Stadil,-F; Holst,-J-J** 1997b The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 amide on gastric acid secretion in humans depends on an intact vagal innervation. *Gut*. 1997 May; 40(5):597-601
- Wettergren,-A; Pridal,-L; Wojdemann,-M; Holst,-J-J** 1998a Amidated and non-amidated glucagon-like peptide-1 (GLP-1): non-pancreatic effects (cephalic phase acid secretion) and stability in plasma in humans. *Regulatory Peptides*. 1998 Oct 16; 77(1-3):83-7
- Wettergren,-A; Wojdemann,-M; Holst,-J-J** 1998b Glucagon-like peptide-1 inhibits gastropancreatic function by inhibiting central parasympathetic outflow. *The American Journal of Physiology*. 1998 Nov; 275(5 Pt 1):G984-92
- Wettergren,-A; Wojdemann,-M; Holst,-J-J** 1998c The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide on antral motility is antagonized by its N-terminally truncated primary metabolite GLP-1 (9-36)amide. *Peptides*. 1998; 19(5):877-82
- Wheeler,-M-B; Lu,-M; Dillon,-J-S; Leng,-X-H; Chen,-C; Boyd,-A-EIII** 1993 Functional expression of the rat glucagon-like peptide-I receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C. *Endocrinology*. 1993;133:57-62
- Wheeler,-M-B; Gelling,-R-W; Hinke,-S-A; Tu,-B; Pederson,-R-A; Lynn,-R; Ehses,-J; MacIntosh,-C-H** 1999 Characterization of the carboxyl-terminal domain of the rat glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor. A role for serines 426 and 427 in regulating the rate of internalization. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274:24593-601
- White,-J-W; Saunders,-G-F** 1986 Structure of the human glucagon gene. *Nucleic*

Acids Research. 1986; 14:4719-4730

- Widmann,-C; Dolci,-W; Thorens,-B** 1995 Agonist-induced internalization and recycling of the glucagon-like peptide-1 receptor in transfected fibroblasts and in insulinomas. *The Biochemical Journal*. 1995; 310:203-214
- Widmann,-C; Dolci,-W; Thorens,-B** 1996a Desensitization and phosphorylation of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor by GLP-1 and 4-phorbol 12-myristate 13-acetate. *Molecular Endocrinology*. 1996 Jan; 10(1):62-75
- Widmann,-C; Dolci,-W; Thorens,-B** 1996b Heterologous desensitization of the glucagon-like peptide-1 receptor by phorbol esters requires phosphorylation of the cytoplasmic tail at four different sites. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996 Aug 16; 271(33):19957-63
- Widmann,-C; Dolci,-W; Thorens,-B** 1997 Internalization and homologous desensitization of the GLP-1 receptor depend upon phosphorylation of the receptor carboxy tail at the same three sites. *Molecular Endocrinology*. 1997; 11:1094-1102
- Wildhage,-I; Trusheim,-H; Goke,-B; Lankat-Buttgereit,-B** 1999 Gene expression of the human glucagon-like peptide-1 receptor is regulated by Sp1 and Sp3. *Endocrinology*. 1999 Feb; 140(2):624-31
- Willms,-B; Werner,-J; Holst,-J-J; Orskov,-C; Creutzfeldt,-W; Nauck,-M-A** 1996 Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1996 Jan; 81(1):327-32
- Willms,-B; Idowu,-K; Holst,-J-J; Creutzfeldt,-W; Nauck,-M-A** 1998 Overnight GLP-1 normalizes fasting but not daytime plasma glucose levels in NIDDM patients. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 1998; 106(2):103-7
- Wilmen,-A; Göke,-B; Göke,-R** 1996 The isolated N-terminal extracellular domain of the glucagon-like peptide-1 (GLP)-1 receptor has intrinsic binding activity. *FEBS-Letters*. 1996 Nov 25; 398(1):43-7
- Wilmen,-A; Van-Eyll,-B; Göke,-B; Göke,-R** 1997 Five out of six tryptophan residues in the N-terminal extracellular domain of the rat GLP-1 receptor are essential for its ability to bind GLP-1. *Peptides*. 1997; 18(2):301-5
- Wilmen,-A; Walkenbach,-A; Fuller,-P; Lankat-Buttgereit,-B; Göke,-R; Göke,-B** 1998 The genomic organization of the human GLP-1 receptor gene. *Experimental*

- and Clinical Endocrinology and Diabetes. 1998; 106(4):299-30
- Wishart,-J-M; Horowitz,-M; Morris,-H-A; Jones,-K-L; Nauck,-M-A** 1998
Relation between gastric emptying of glucose and plasma concentrations of
glucagon-like peptide-1. *Peptides*. 1998; 19(6):1049-53
- Xiao,-Q; Jeng,-W; Wheeler,-M-B** 2000 Characterization of glucagon-like peptide-1
receptor-binding determinants. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2000 Dec;
25(3):321-35
- Xiao,-Q; Giguere,-J; Parisien,-M; Jeng,-W; St-Pierre,-S-A; Brubaker,-P-L** 2001
Biological activities of glucagon-like peptide-1 analogues in vitro and in vivo.
Biochemistry. 2001 Mar 6; 40(9):2860-9
- Xu,-G; Stoffers,-D-A; Habener,-J-F; Bonner-Weir,-S** 1999 Exendin-4 stimulates
both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and
improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. 1999 Dec; 48(12):2270-6
- Yalow,-R-S; Berson,-S-A** 1960 Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
The Journal of Clinical Investigation. 1960; 39:1157-1165
- Yamato,-E; Ikegami,-H; Takekawa,-K; Fujisawa,-T; Nakagawa,-Y; Hamada,-Y;
Ueda,-H; Ogihara,-T** 1997 Tissue-specific and glucose-dependent expression of
receptor genes for glucagon and glucagon-like peptide-1 (GLP-1). *Hormone and
Metabolic Research*. 1997 Feb; 29(2):56-9
- Yang,-H; Egan,-J-M; Wang,-Y; Moyes,-C-D; Roth,-J; Montrose,-M-H;
Montrose-Rafizadeh,-C** 1998 GLP-1 action in L6 myotubes is via a receptor different
from the pancreatic GLP-1 receptor. *The American Journal of Physiology*. 1998
Sep; 275(3 Pt 1):C675-83
- Yang,-H; Egan,-J-M; Rodgers,-B-D; Bernier,-M; Montrose-Rafizadeh,-C** 1999
Differential expression of a novel seven transmembrane domain protein in
epididymal fat from aged and diabetic mice. *Endocrinology*. 1999 Jun;
140(6):2859-67
- Yoshimoto,-S; Hirota,-M; Ohboshi,-C; Shima,-K** 1989 Identification of glucagon-
like peptide-1(7-36)amide in rat brain. *Annual Clinical Biochemistry*. 1989;
26:169-171
- Zawalich,-W-S; Zawalich,-K-C** 1996 Glucagon-like peptide-1 stimulates insulin
secretion but not phosphoinositide hydrolysis from islets desensitized by prior
exposure to high glucose or the muscarinic agonist carbachol. *Metabolism*. 1996
Feb; 45(2):273-8

- Zueco,-J-A; Esquifino,-A-I; Chowen,-J-A; Alvarez,-E; Castrillon,-P-O; Blazquez,-E** 1999 Coexpression of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor, vasopressin, and oxytocin mRNAs in neurons of the rat hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: effect of GLP-1(7-36)amide on vasopressin and oxytocin release. *The Journal Neurochemistry*. 1999 Jan; 72(1):10-6
- Zunz,-E; LaBarre,-J** 1929 Contributions a l'étude des variations physiologiques de la secretion interne du pancreas: relations entre les secretions externe et interne du pancreas. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*. 1929; 31:20-44

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Marburg: Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Christiansen, Daut, Feuser, Fuhrmann, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Kern, Klenk, Koolman, Oertel, Schäfer, Schachtschabel, Schulze, Seifart, Steiniger, Thomas, von Wichert, Westermann.

in Düsseldorf: Abholz, Ackermann, Borsch-Galetke, Gabbert, Hofer, Röhrs, Scherbaum, Schrör, Sundmacher, Tarnow, Tress.

in Wien: Deecke, Ehrenberger, Husslein, Knobler, Urbanek.

in Münster: Schnelle, Schwenzer.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R. Göke danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, sowie die Förderung zur Realisierung der vorliegenden Arbeit. Besonders möchte ich mich für die engagierte Einweisung in die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens und die Geduld und Ausdauer bei der Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank geht auch an Herrn H. Schmidt und Frau P. Fuller, die mir bei technischen Fragen immer zur Seite standen, und an Frau Dr. med. A. Göke und Dr. A. Wilmen, von denen ich mir bei allen Fragen der Molekularbiologie Rat holen konnte.

Dank auch an Dr. G.P. McGregor, PhD. für die Unterstützung bei der radioaktiven Markierung der Peptide.

Für die Zusammenarbeit bei der Synthese der Analoga möchte ich Frau Dr. E. Hoffmann danken.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der klinischen Forschergruppe für Gastrointestinale Endokrinologie von Herrn Prof. Dr. med. R. Göke und Herrn Prof. Dr. med. B. Göke für stete Hilfsbereitschaft.